

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1930-1931

N° 15

LA

BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE

CONDITIONS DE DÉVELOPPEMENT

AUTOLYSATS — EXTRAITS BACILLAIRES

FORMES ASPOROGENES ET ATTÉNUATION DE LA VIRULENCE

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE LE 20 MAI 1931

PAR

Pierre VILLEDIEU

Pharmacien

Interne des Hôpitaux de Paris

Ancien-Elève de l'Institut Pasteur

JURY : { MM. RADAIS, *Président.*
SOMMELET, *Professeur.*
BACH, *Agrégé.*

SAINT-DIZIER

ÉTABLISSEMENTS ANDRÉ BRULLIARD

1931



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1930-1931

N° 15

LA

BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE

CONDITIONS DE DÉVELOPPEMENT

AUTOLYSATS — EXTRAITS BACILLAIRES

FORMES ASPOROGÈNES ET ATTÉNUATION DE LA VIRULENCE

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de

Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE LE 20 MAI 1931

PAR

Pierre VILLEDIEU

Pharmacien

Interne des Hôpitaux de Paris

Ancien Elève de l'Institut Pasteur

JURY : { MM. RADAIS, *Président.*
SOMMELET, *Professeur.*
BACH, *Agrégé.*

SAINT-DIZIER

ÉTABLISSEMENTS ANDRÉ BRULLIARD

1931

Personnel de la Faculté de Pharmacie

ADMINISTRATION

MM. RADAIS, *Doyen*, O. *, O I.
 PERROT, *Assesseur*, O. *, O I.
 G. DURSENT, *Secrétaire*, *, O I.

PROFESSEURS

MM. RADAIS, O. *, O I.	Gryptogamie et Microbiologie.
BÉHAL, Membre de l'Institut, G. O. *, O I.	Chimie organique.
PERROT, O. *, O I.	Histoire naturelle des Médicaments.
COUTIÈRE, O. *, O I.	Zoologie.
LEBEAU, O. *, O I.	Pharmacie chimique.
GUERBET, *, O I.	Toxicologie.
BOUGAULT, *, O I.	Chimie analytique.
GORIS, *, O I.	Pharmacie galénique.
GUÉRIN, *, O I.	Botanique générale.
TASSILLY, *, O I.	Physique.
DAMIENS, *, O I.	Chimie minérale.
HERISSEY, O. *, O I.	Chimie biologique.
SOMMELET, *, O I.	Hydrologie et Hygiène.

Professeurs honoraires : MM. A. VILLIERS, *, O I, GRIMBERT, *, O I.
 et DELÉPINE, O. *, O I.

CHARGÉS DE COURS

MM. MARC HONNORAT, *, O I.	Législation, Déontologie pharmaceu- tique.
LUTZ, *, O I.	Cryptogamie.
LAUNOY, O. *, O I.	Pharmacodynamie.
FABRE, O. I.	Minéralogie.

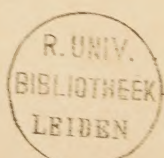
AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. LUTZ, *, O I.	MM. PICON, O I.	MM. BACH, O I.
LAUNOY, O. *, O I.	FABRE, O I.	BEDEL, O I.
DELABY, *, O I.	MASCRÉ, O I.	RÉGNIER, O I.
	FLEURY, O I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, O I., agrégé, chargé des T. P. de 1 ^{re} année	Chimie générale.
FABRE, O I. et RÉGNIER, O I. agrégés, chargés des travaux de.	Chimie analytique.
SOUÈGES, O I.	Micrographie.
LEROUX, O I.	Physique.
DEVAL, O I.	Microbiologie.
DELABY, *, O I, PICON, O I, et FLEURY, O I, agrégés, chargés des Travaux généraux de 4 ^e année.	

Bibliothécaire en Chef : M. BEAULIEUX, O I.



A Monsieur le PROFESSEUR ACHARD

Secrétaire général de l'Académie de Médecine

Membre de l'Institut

Commandeur de la Légion d'Honneur

A Monsieur le PROFESSEUR RADAIS

Doyen de la Faculté de Pharmacie

Membre de l'Académie de Médecine

Officier de Légion d'Honneur

Hommage de respect et de gratitude.

A Monsieur MAURICE PIETTRE

Directeur du Laboratoire des Halles Centrales de Paris
Membre de l'Académie d'Agriculture
Chevalier de la Légion d'Honneur

en témoignage de respectueux attachement
et de profonde gratitude.

A Monsieur le PROFESSEUR SOMMELET

Pharmacien des Hôpitaux
Chevalier de la Légion d'Honneur

A Monsieur le PROFESSEUR AGRÉGÉ BACH

Pharmacien des Hôpitaux

Sentiments de vive reconnaissance.

AUX MIENS

A MES AMIS

INTRODUCTION

Les recherches sur les conditions de développement et surtout de sporulation de la bactéridie charbonneuse, qui représentaient le sujet principal de notre travail, nous ont conduit à des résultats particulièrement intéressants. Elles ont établi notamment la relation existant entre la pauvreté des milieux de culture et la sporulation. On admet généralement que l'une favorise l'autre, cette conception semble plutôt une apparence qu'une réalité. Si, en effet, dans le milieu relativement pauvre qu'est la gélose non peptonée, la formation des spores est rapide, elle devient infiniment plus abondante dans un milieu enrichi par l'addition de peptone, aliment de choix de la bactéridie, mais cette formation n'apparaît qu'assez tard, lorsque le mycélium a achevé son évolution végétative. La pesée des cultures dans les deux cas, une fois l'optimum de sporulation obtenu, confirme très nettement cette conclusion. En outre, l'emploi des milieux dits « de carence », préconisés par M. PIETTRE dans son travail sur la production du café et en particulier le milieu gélose-gélatine convenablement minéralisé ou « milieu P.V. », que nous avons réalisé avec succès, aboutit à une forme pratiquement asporogène de la bactéridie de DAVAINÉ, alors que le développement du mycélium est poussé à son maximum. La pauvreté du milieu ne doit donc pas être considérée comme un facteur essentiel de la sporulation, mais tout au plus comme un élément de la vitesse de sporulation d'un mycélium ayant rapidement épuisé les éléments nutritifs contenus dans le milieu.

L'étude de la formation de la spore nous a montré en outre que celle-ci représente une partie relativement faible de l'élément

bacillaire dans lequel elle se forme. Après l'apparition de la spore, le reste protoplasmique se désagrège rapidement et se disperse dans le milieu extérieur qui s'enrichit ainsi en matières protidiques nouvelles. Nous avons été ainsi entraîné à l'étude de ces substances, de ces autolysats, que l'on sait aujourd'hui représenter de véritables antigènes, provoquant en présence des anticorps correspondants des réactions de floculation très caractéristiques. La faveur dont jouit depuis quelques mois l'étude des substances protidiques, introduite en médecine sous l'initiative hardie et bienfaisante de M. le Professeur ACHARD, nous a encouragé dans cette voie féconde de la biochimie.

Enfin la réalisation d'un milieu pauvre permettant l'obtention rapide et abondante d'un mycélium charbonneux pratiquement asporogène nous a fait aborder la question de virulence étroitement liée à l'absence de la spore. La préoccupation prédominante pour résoudre le problème de l'atténuation de la bactériodie, en vue de la préparation de vaccins anticharbonneux, a toujours été de préparer des cultures privées de spores. Ce que les premiers bactériologistes ont obtenu par la chaleur (PASTEUR, CHAUVEAU), par les antiseptiques (CHAMBERLAND, ROUX), il nous a été possible de le réaliser par une simple modification de la nutrition, moyen beaucoup plus doux respectant l'activité végétative de la bactériodie, activité qui sur « milieu P.V. » se manifeste après une courte phase d'adaptation avec une vigueur inespérée. Dès lors, l'atténuation de la virulence a pu être obtenue complète, totale, après un très petit nombre de passages (quatre seulement) et, chose très intéressante encore, cette modification atteint la spore elle-même qui *fixe ainsi la virulence du mycélium dont elle provient.*

*
* * *

Que M. le Professeur ACHARD veuille bien trouver ici l'hommage de notre profonde et respectueuse gratitude pour la très grande bienveillance qu'il n'a cessé de nous témoigner au cours de nos travaux.

Nous tenons particulièrement à exprimer notre très vive reconnaissance à M. le Professeur RADAIS pour les conseils éclairés qu'il nous a prodigués, et qui nous a fait le grand honneur de présider le jury de cette thèse.

A M. le Professeur SOMMELET, notre maître dans les Hôpitaux, à M. le Professeur agrégé BACH, qui nous ont grandement encouragé et qui ont bien voulu faire partie de ce jury, nous exprimons notre profonde gratitude.

Nous n'aurions garde de terminer ces quelques lignes sans exprimer nos remerciements et notre respectueux attachement à M. Maurice PIETTRE, Directeur du Laboratoire du Service Vétérinaire des Halles Centrales de Paris, qui a bien voulu nous accueillir avec son amabilité coutumière sur les précieuses recommandations de M. le Professeur ACHARD et de M. le Doyen RADAIS. Il nous a guidé de ses nombreux et précieux conseils dans ces recherches longues et délicates sur un sujet qui ploie sous une bibliographie immense.

Remercions enfin nos collègues d'internat et tous nos camarades qui nous ont témoigné une si cordiale et si bienveillante sympathie.

PLAN DU TRAVAIL

PREMIÈRE PARTIE. — *Influence de la richesse des milieux de culture sur le développement et la sporulation de la bactérie charbonneuse :*

Culture sur des milieux diversement riches en peptone.

Poids de la culture en relation avec le poids de peptone, teneur de cette culture en $P^{2}O^{5}$.

DEUXIÈME PARTIE. — *Autolysats-Dérivés de l'Antigène. — Application à la bactérie charbonneuse :*

Filtration des milieux de culture.

Précipitation des substances précipitogènes dans les milieux filtrés.

Solubilisation de ces substances précipitogènes.

Floculation avec du sérum anticharbonneux.

TROISIÈME PARTIE. — *Extraits bacillaires. — Application à la bactérie charbonneuse :*

Attaque par la soude de bacilles charbonneux lavés.

Caractérisation dans le soluté sodique d'éléments constituant de ces mêmes bacilles au moyen de réactions de floculation avec du sérum spécifique.

QUATRIÈME PARTIE. — *pH. — Acidité et alcalinité totales des milieux de culture, leur relation avec le développement de la bactérie charbonneuse :*

Limites de pH.

Variations du pH.

Variations de l'acidité et de l'alcalinité totales.

Etude du pH, de l'acidité et de l'alcalinité totales sur des milieux synthétiques.

CINQUIÈME PARTIE. — *La bactériodie charbonneuse, formes asporogènes, atténuation de la virulence :*

Formes asporogènes sur milieu de « carence » gélose-gélatine.

Atténuation de la virulence sur ce même milieu.

Essai de retour à la virulence par passage sur un milieu riche.

Immunité des animaux ayant résisté à l'inoculation de la bactériodie atténuée.

PREMIÈRE PARTIE

INFLUENCE
DE LA RICHESSE DU MILIEU DE CULTURE
SUR LE DÉVELOPPEMENT
DE LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE
ET PLUS PARTICULIÈREMENT
SUR LA SPORULATION

Avant d'exposer les recherches expérimentales que nous avons réalisées, nous résumerons très rapidement les connaissances classiques sur les conditions de développement de la bactéridie charbonneuse dans les divers milieux de culture en usage dans les laboratoires de microbiologie. La bactéridie charbonneuse est essentiellement aérobie. La température optimum des cultures est 35-37°, mais la bactéridie se développe entre + 12° et + 45°. Les températures limites pour la formation des spores sont 16 et 42°. Le milieu de culture doit être légèrement alcalin, dans un milieu neutre le développement est plus faible.

Sur *bouillon nutritif* au bout de quelques heures apparaissent de légers flocons, puis ces flocons s'épaississent, deviennent cohérents et tombent au fond du vase, le bouillon surnageant restant parfaitement clair.

En *eau peptonée* le développement est analogue.

La *gélatine* est liquéfiée par la bactéridie. En piqûre à 20° apparaît dès le 2^e jour un trait blanchâtre d'où naissent bientôt à angle droit de nombreux et délicats filaments duveteux, rappelant l'aspect de l'arbre de Saturne. La culture s'accroît les jours suivants, les filaments s'épaississent, puis la gélatine se liquéfie à la partie supérieure du tube, la liquéfaction envahit

peu à peu tout le milieu et est totale vers le 10^e ou 12^e jour. On voit alors, dans la gélatine liquéfiée, nager de gros flocons blancs qui finissent par tomber au fond du tube. En plaques, apparaissent dès le 2^e jour des petits points blancs grisâtres disséminés dans la gélatine. Ces points augmentent rapidement de volume et forment des taches brunâtres, granuleuses, arrondies, à bords sinueux. Un faible grossissement montre que ces colonies sont constituées par des filaments enchevêtrés, ce qui leur donne l'aspect d'un peloton de fil emmêlé. Vers le 4^e ou 5^e jour, les colonies semblent formées par des mèches ondulées rappelant l'aspect de cheveux bouclés, puis la gélatine se liquéfie autour des colonies, celles-ci se désagrègent et forment des flocons nageant dans le produit de liquéfaction.

Sur *gélose inclinée*, dès le 1^{er} jour, si l'ensemencement n'a pas été trop abondant, on voit se former des colonies blanchâtres, arrondies, à bords encore sinueux. Puis, peu à peu, toute la surface de la gélose se recouvre d'un enduit crémeux qui s'épaissit rapidement.

Sur *pomme de terre* un enduit blanchâtre se développe dès le second jour, il épaissit rapidement et prend une coloration blanc sale qui tourne au brun en vieillissant.

Sur *sérum liquide*, il se produit des flocons nuageux qui tombent ensuite au fond du vase. Sur *sérum solidifié*, on obtient des stries d'un blanc mat qui devient grisâtre au bout de quelques jours, puis le milieu se liquéfie en partie.

Le *lait* en tube se coagule vers le 3^e ou le 4^e jour, le coagulum se redissout vers le 8^e. En ballon la coagulation ne se produit pas.

La formation très rapide et très facile de spores dans les milieux de culture est un des principaux caractères du charbon, aussi les premiers bactériologistes, et parmi eux le plus illustre de tous, PASTEUR, ont-ils étudié avec beaucoup de soin la sporulation et cela d'autant plus qu'ils se sont aperçu très vite que la spore représentait l'obstacle le plus grand à l'obtention des vaccins. Pour les vaincre, c'est-à-dire pour préparer des vaccins non sporulés, les seuls susceptibles d'atténuation bien mesurée, il fallait connaître de très près les conditions de formation des spores.

L'oxygène, comme on le sait, est une de ces conditions, sans doute la plus importante de toutes. C'est en particulier à son influence qu'il faut rapporter les différences considérables existant entre les milieux solides et les milieux liquides. Si en effet dans ces derniers la sporulation est peu active et incomplète, alors que dans les premiers au contraire elle est très active et donne lieu, après un séjour suffisant à l'étuve, à une disparition presque complète des bâtonnets au profit des spores, cela tient à la différence d'aération de ces milieux. Dans le bouillon peptoné, l'eau peptonée, etc..., les surfaces seules sont largement au contact de l'air, en profondeur il y a insuffisance d'oxygène et les petites quantités qui ont pu s'y dissoudre sont vite absorbées. Sur les milieux solides inclinés, la surface de contact avec l'air est au contraire très large et les échanges gazeux sur la couche culturale sont très faciles.

Cette influence primordiale de l'oxygène se trouve encore accentuée si l'on songe que la nature, la richesse du milieu apparaissent plutôt comme secondaires : la sporulation sera favorisée sur les milieux solides à large surface, ralentie et moindre en milieux liquides plus difficilement oxygénés, même si ces derniers sont plus riches.

Quelle est exactement l'influence de la richesse des milieux en substances nutritives sur la sporulation ? Alors que le rôle de l'oxygène est parfaitement établi, cette question est restée sans solution bien certaine, en raison d'ailleurs de son peu d'importance pratique, car qu'il y ait dans une culture beaucoup ou peu de spores, peu importe, ce qui compte ce n'est pas tant le nombre mais la présence de ces spores, formes de résistance et de conservation de la virulence. Mais en outre on lui a donné une interprétation quelque peu artificielle. Les bactériologistes émettent en effet comme règle que la *sporulation se trouve favorisée* par la *pauvreté des milieux*. Dans un milieu peu riche à l'origine ou qui le devient par un épuisement rapide, la sporulation trouve son optimum. Les produits de fermentation, les toxines auraient le même rôle. Le microbe pour résister aux conditions antagonistes de toutes sortes, pour se défendre, pour perpétuer

sa race, formerait sa spore. La spore pour les bactériologistes semble donc devenir essentiellement une forme de résistance.

Certains faits semblent *apparemment* leur donner raison : on sait qu'il est de règle à l'Institut Pasteur, pour obtenir rapidement des spores charbonneuses, d'employer la gélose ou le bouillon simple de viande, mais sans peptone. En effet, si on suit un tel milieuensemencé de bactériidies, on voit très vite se former des spores ; au bout de 24 heures elles sont déjà en nombre égal aux bâtonnets, en 2 ou 3 jours toute la culture est à peu près entièrement sporulée. Par contre, préparons des milieux riches, la gélose peptonée par exemple, nous remarquons que la formation des spores se fait beaucoup plus lentement, le maximum est atteint seulement après une douzaine de jours d'étuve. L'étude jour par jour des cultures montre que tout l'effort de la bactériodie est d'abord tendu vers la multiplication de son mycélium par scissiparité : la gélose se couvre d'une couche beaucoup plus épaisse que dans les milieux non peptonisés, c'est la phase de végétabilité qui prédomine et elle se prolonge tant que le milieu n'est pas épuisé. Alors à ce moment et à partir de ce moment surtout commence la sporulation proprement dite, mais une sporulation qui aboutit à des rendements bien plus importants qu'avec des milieux pauvres et c'est compréhensible puisque le mycélium est incomparablement plus abondant. Le végétal arrivé ainsi à son maximum de développement fructifie et comme une plante donne sa graine.

Entre les milieux pauvres et les milieux riches nous admettons donc seulement deux différences essentielles : une différence de quantité de spores et une différence de temps. Dans les premiers, rapide sporulation mais rendement assez faible, dans les seconds, sporulation retardée mais rendement infiniment plus abondant. Et puis si la spore se forme dès que des conditions défavorables surviennent, comment admettre que la chaleur, que les antiseptiques comme l'acide phénique ou le bichromate de potasse, que des milieux pauvres ou « de carence » comme notre milieu gélose-gélatine (nous le verrons plus loin) raréfient et suppriment même toute sporulation ?

La spore devient ainsi la graine des botanistes, prise dans sa conception la plus large, une graine tout à fait comparable à un grain de blé : plus le terrain où poussera ce blé sera riche, plus la culture sera abondante et le rendement en graines élevé. Quant à la sporulation favorisée par des milieux de cultures pauvres, nous sommes en présence d'une apparence plutôt que d'une réalité.

C'est guidé par ces vues théoriques que nous avons imaginé les expériences suivantes :

Nous avons réalisé une série de cultures en milieu pauvre (gélose sans peptone suivant la technique de l'Institut Pasteur) et en milieux diversement riches (eau peptonée avec des doses décroissantes de peptone : 20, 10, 5, 2 pour 1.000 et gélose peptonée ordinaire à 10 pour 1.000). Pour chaque expérience nous avons attendu la fin de l'évolution de la culture correspondant au maximum de sporulation, puis nous avons recueilli et pesé dans chaque cas la culture finale. Ainsi donc à la méthode simplement qualitative, la seule employée jusqu'ici, nous avons substitué la méthode quantitative, la seule qui donnant des poids permet des conclusions sûres et précises. En résumé, nous aurons d'un côté des milieux de culture liquides avec des doses décroissantes de peptone, des milieux de culture solides avec et sans peptone, et de l'autre côté des cultures microbiennes contenant leur maximum de spores, celles-ci étant toujours, tout au moins pour les milieux en question, en relation directement proportionnelle à la quantité de mycélium.

MÉTHODES D'ÉTUDE

On prépare les diverses variétés de milieux liquides et solides, les uns pauvres, les autres riches en éléments nutritifs.

Milieux liquides : Nous avons choisi le plus simple de tous, l'eau peptonée, dont il suffit de faire varier la teneur en peptone pour avoir une échelle assez large de milieux ayant des concen-

trations données de cet élément nutritif. En particulier, nous avons opéré avec des teneurs de 20, 10, 5 et 2 pour 1.000. Le milieu est réparti par 200^{cc} dans des fioles d'Erlenmeyer de 1.000^{cc}, la faible épaisseur (quelques centimètres) facilitera un large accès de l'air. La réaction de l'eau peptonée utilisée est légèrement alcaline, avec de la soude titrée nous l'amenons colorimétriquement au pH 7,4, pH qui nous a semblé, après de multiples essais, le plus favorable au développement de la bactériodie charbonneuse. Les ensemencements sont faits avec une souche sur gélose peptonée âgée de six jours (1). On laisse à l'étuve à 35-37° pendant quinze jours afin d'avoir un développement microbien et sporifère le plus complet possible. Chaque jour les cultures sont agitées légèrement pour faciliter l'aération.

Milieux solides. — Nous avons choisi d'une part la gélose inclinée ordinaire avec la dose normale de peptone (10 pour 1.000) et d'autre part la gélose privée de peptone.

Ces milieux solides sont répartis en boîtes de Roux et ils y sont coulés de façon à former des plaques uniformes et d'égale épaisseur. L'ensemencement se fait avec la même souche que pour les milieux liquides et le séjour à l'étuve est également de 15 jours.

On suit au microscope entre lame et lamelle le développement de ces diverses cultures. Après ce séjour de 15 jours à l'étuve les cultures sur eau peptonée sont centrifugées très rapidement. Les cultures solides en boîtes de Roux sont raclées avec un pinceau et de l'eau distillée stériles (on évite d'entraîner la gélose). Tous les éléments microbiens sont ainsi recueillis et on obtient une émulsion qui sera centrifugée comme les cultures liquides.

Les culots obtenus contiennent deux sortes d'éléments : microbes non autolysés et spores. Dans toutes ces expériences on recueille avec grand soin le liquide de centrifugation contenant les produits de fermentation et les corps microbiens autolysés, ce sont ces liquides qui nous serviront plus loin pour l'étude des dérivés de l'antigène. Ces culots de centrifugation sont repris

(1) La souche mère de bactériodie charbonneuse nous a été très aimablement donnée par M. RINGEARD, chef de service au Laboratoire de recherches de l'Ecole vétérinaire d'Alfort.

par de petites quantités d'eau distillée légèrement acidulée pour dissoudre, autant que faire se peut, les phosphates alcalino-terreux qui ont pu être précipités par suite du milieu légèrement alcalin des cultures. On centrifuge à nouveau et on lave une deuxième fois avec de l'eau distillée, ces deux opérations successives sont répétées trois fois. Les culots finalement réémulsionnés dans quelques centimètres cubes d'eau distillée sont recueillis dans des capsules de platine préalablement tarées. On évapore au bain-marie, on achève la dessiccation à l'étuve à 105-107° et on pèse l'extrait sec obtenu. De cette façon nous aurons un aperçu quantitatif de l'importance du développement microbien (bâtonnets et spores).

Nous avons cru intéressant de connaître la valeur en cendres et en éléments phosphorés de cet extrait sec, dans ce but nous l'avons calciné pour avoir le poids des cendres. Ces mêmes cendres ont été reprises par de l'eau distillée en présence d'acide azotique et ont servi au dosage du phosphore suivant la technique classique par précipitation molybdique (réactif de SONNENSCHNEIDER et EGGERTZ). Néanmoins au lieu de peser directement le phosphomolybdate obtenu, nous l'avons chauffé dans un creuset de GOOCH jusqu'à transformation en anhydride phosphomolybdique, de coloration bleuâtre, représentant pour 100 : 1,723 de phosphore (en suivant la technique et les précautions indiquées par HUNDESHAGEN, WOY, TREADWELL et surtout H. MAURICE).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Signalons tout d'abord les résultats de l'examen microscopique à l'état frais des diverses cultures. Pour les milieux liquides d'une part, pour les milieux solides d'autre part, on note un nombre de spores toujours proportionnel au nombre des bâtonnets. De plus comme nous l'avons indiqué précédemment, pour les milieux solides, là où il n'y a pas de peptone la sporulation est

tout de suite très active et presque achevée au bout de trois jours, là où il y a de la peptone le développement microbien est beaucoup plus intense et la sporulation n'est terminée qu'au bout d'une douzaine de jours. Pour les milieux liquides la sporulation est toujours très peu active et toujours incomplète même au bout de 15 jours et quelle que soit la teneur en élément nutritif.

A. — Milieux liquides.

Pour chacune des opérations qui vont suivre, 1.000^{cc} d'eau peptone sont ensemencées dans 5 fioles d'Erlenmeyer. Séjour de 15 jours à l'étuve à 35-37° et suite des opérations comme il a été indiqué ci-dessus. La peptone utilisée est toujours la peptone Chapoteaut.

I. — Eau peptonée à 20 pour 1.000.

1°	Extrait sec (1).	0 gr. 1500
	Cendres.	0 gr. 00186

Les cendres sont blanches, infusibles : reprises par quelques centimètres cubes d'eau distillée, elles communiquent à cette dernière une réaction fortement alcaline au tournesol Gallois (2).

Phosphore : anhydride phosphomo-

lybdiq.	0 gr. 1124
soit en phosphore . . .	0 gr. 001936
soit en P_2O_5	0 gr. 00443
	(23.81 % des cendres)

1. Pour éviter toute confusion nous appelons chaque fois l'extrait sec, les cendres et le Phosphore les valeurs obtenues sur 1.000^{cc} d'eau peptonée pour les milieux liquides, et sur la gélose de cinq boîtes de Roux pour les milieux solides étudiés plus loin.

(2) Le papier de tournesol (marque Gallois) constitue un réactif particulièrement sensible et il a l'avantage de virer à peu près exactement au pH 7. Nous nous sommes servi constamment de ce papier réactif au cours de notre travail.

2 ^o	<i>Extrait sec</i>	0 gr. 1619
	<i>Cendres</i>	0 gr. 0213
	<i>Phosphore</i> : anhydride phospho-	
	molybdique	0 gr. 1291
	soit en phosphore . . .	0 gr. 002224
	soit en P^2O^5	0 gr. 00509
		(23,89% des cendres)

3 ^o	<i>Extrait sec</i>	0 gr. 1491
	<i>Cendres</i>	0 gr. 0179
	<i>Phosphore</i> anhydride phospho-	
	molybdique	0 gr. 1015
	soit en phosphore . . .	0 gr. 00174
	soit en P^2O^5	0 gr. 00398
		(22,23% des cendres)

II. — Eau peptonée à 10 pour 1.000.

1 ^o	<i>Extrait sec</i>	0 gr. 1351
	<i>Cendres</i>	0 gr. 0154

Ces cendres reprises par l'eau sont très légèrement alcalines au tournesol. Elles sont blanches et infusibles.

	<i>Phosphore</i> anhydride phospho-	
	molybdique	0 gr. 0754
	soit en phosphore . . .	0 gr. 00129
	soit en P^2O^5	0 gr. 00295
		(19,15% des cendres)

2 ^o	<i>Extrait sec</i>	0 gr. 1091
	<i>Cendres</i>	0 gr. 0099
	<i>Phosphore</i> anhydride phospho-	
	molybdique	0 gr. 0594
	soit en phosphore . . .	0 gr. 00102
	soit en P^2O^5	0 gr. 00233
		(25,53% des cendres)

3 ^e	Extrait sec	0 gr. 1099
	Cendres	0 gr. 0129
	Phosphore anhydride phospho- molybdique	0 gr. 0671
	soit en phosphore . . .	0 gr. 00115
	soit en P^2O_5	0 gr. 00263
	(20,39 ^o o des cendres)	

III. — Eau peptonée à 5 pour 1.000.

1 ^o	Extrait sec	0 gr. 0939
	Cendres	0 gr. 0081
	Phosphore anhydride phospho- molybdique	0 gr. 0596
	soit en phosphore . . .	0 gr. 00102
	soit en P^2O_5	0 gr. 00233
	(28,76 ^o o des cendres)	

2 ^o	Nous n'avons indiqué ici que l'extrait sec et les cendres.	
	Extrait sec	0 gr. 1014
	Cendres	0 gr. 0084

IV. — Eau peptonée à 2 pour 1.000.

1 ^o	Extrait sec	0 gr. 0941
	Cendres	0 gr. 0079
	Phosphore anhydride phospho- molybdique	0 gr. 0502
	soit en phosphore . . .	0 gr. 000864
	soit en P^2O_5	0 gr. 00197
	(14,95 ^o o des cendres)	

2 ^o	Nous ne donnons que l'extrait sec et les cendres.	
	Extrait sec	0 gr. 0898
	Cendres	0 gr. 0077

B. — Milieux solides.

I. — Gélose peptonée en boîtes de Roux.

La gélose (avec 10 pour 1.000 de peptone Chapoteaut) est répartie en cinq boîtes de Roux et enfermées avec la souche habituelle de bactérie charbonneuse sur gaze. Après les 15 jours d'étude ces boîtes sont baignées avec 200^{cc} d'eau distillée. L'emballage antiseptique est traité comme nous l'avons indiqué plus haut.

1°	Extrait sec	1 gr. 0704
	Cendres	0 gr. 1224

Les cendres sont blanches, infusibles ; reprises par l'eau distillée, elle communiquent toujours à cette dernière une réaction fortement alcaline (Cao libre).

Phosphore	anhydride phospho-	
	molybdique . . .	0 gr. 5460
	soit en phosphore . .	0 gr. 009407
	soit en P^2O^5	0 gr. 02154
		(17,51 % des cendres)

2°	Extrait sec	1 gr. 0494
	Cendres	0 gr. 0927

Phosphore	anhydride phospho-	
	molybdique . . .	0 gr. 5150
	soit en phosphore . .	0 gr. 00887
	soit en P^2O^5	0 gr. 02031
		(21,80 % des cendres)

3°	Extrait sec	1 gr. 2440
	Cendres	0 gr. 1225

Phosphore	anhydride phospho-	
	molybdique . . .	0 gr. 5949
	soit en phosphore . .	0 gr. 01025
	soit en P^2O^5	0 gr. 0234
		(19,15 % des cendres)

11. — *Gélose sans peptone en boîtes de Roux.*

Préparation de cette gélose comme la gélose peptonée ordinaire, avec cette seule différence qu'on supprime la peptone. Cette gélose est ensemencée comme précédemment en 5 boîtes de Roux. Même traitement que dans les expériences ci-dessus pour isoler le revêtement microbien (200^{cc} eau distillée).

1 ^o <i>Extrait sec</i>	0 gr. 0895
<i>Cendres</i>	0 gr. 0210

Ces cendres sont infusibles ; reprises par l'eau, on obtient une réaction très faiblement alcaline.

Phosphore. — Vu la faible proportion d'extrait et de cendres obtenue sur ce milieu pauvre, nous n'avons pas jugé utile de procéder au dosage du phosphore. On a pu vérifier cependant par l'abondance relative du précipité de phosphomolybdate d'ammoniaque que les cendres étaient riches en P²O⁵.

2 ^o <i>Extrait sec</i>	0 gr. 1095
<i>Cendres</i>	0 gr. 0295

Les cendres obtenues sont encore blanches, infusibles ; reprises par l'eau, la réaction de celle-ci est toujours alcaline. L'analyse nous montre que nous sommes en présence de phosphate de chaux presque pur.

3 ^o <i>Extrait sec</i>	0 gr. 1308
<i>Cendres</i>	0 gr. 0401

* * *

Le tableau d'ensemble ci-contre résumera d'abord les divers résultats de nos expériences, tant sur les milieux liquides que sur les milieux solides.

MILIEUX LIQUIDES (1000 cc en fioles d'Erlenmeyer).	Extrait sec	Cendres	P ² O ⁵	P ² O ⁵ % (1) des cendres
Eau peptonée	0,1500	0,0186	0,0044	23,81
à 20 pour 1000.....	0,1619	0,0213	0,0050	23,89
	0,1491	0,0179	0,0039	22,23
Eau peptonée	0,1351	0,0154	0,0029	19,15
à 10 pour 1000.....	0,1091	0,0099	0,0023	25,53
	0,1099	0,0129	0,0026	20,39
Eau peptonée	0,0939	0,0081	0,0023	28,76
à 5 pour 1000.....	0,1014	0,0084		
Eau peptonée	0,0941	0,0079	0,0019	24,93
à 2 pour 1000.....	0,0898	0,0067		
MILIEUX SOLIDES (5 boîtes de Roux).				
Gélose avec peptone..	1,0704	0,1224	0,0215	17,51
	1,0494	0,0927	0,0203	21,80
	1,2440	0,1225	0,0234	19,15
Gélose sans peptone..	0,0895	0,0210		
	0,1095	0,0295		
	0,1308	0,0401		

Dans les milieux liquides il y a sans doute une différence en éléments microbiens (bâtonnets et spores), dont le poids augmente avec la richesse du milieu en éléments nutritifs, mais cette variation ne semble pas proportionnelle aux doses de peptone.

Dans les milieux solides au contraire cette relation entre le rendement microbien et la teneur en éléments nutritifs est beaucoup plus étroite.

La richesse des éléments microbiens en P²O⁵ augmente

(1) La teneur en P²O⁵ plus élevée dans les milieux liquides s'explique par la présence dans les culots de centrifugation de phosphates alcalino-terreux, insolubilisés pendant les cultures et entraînés en même temps que les microbes et les spores.

parallèlement aux poids des extraits secs et des cendres. Remarquons que les germinations de *Plasmodium* sont relativement élevées, elles correspondent au développement maximum en spores.

La sporulation dans les milieux pauvres est sans doute très active, comme il est classique de l'admettre ; dans les milieux riches elle est certainement plus lente, mais, comme elle porte sur un nombre plus considérable de parasites, elle est beaucoup plus abondante.

Et ces constatations montrent que la nutrition proprement dite joue un rôle important au point de vue rendement en sporobes et par suite en spores.

DEUXIÈME PARTIE

AUTOLYSATS — DÉRIVÉS DE L'ANTIGÈNE APPLICATION A LA BACTÉRIE CHARBONNEUSE

MM. PIERRE et CHÉFRET dans leurs travaux sur la Bactérie du Charbon, ont constaté que le sérum agglutinant ces bacilles pathogènes. Il s'agit à dire les agglutins en ces propriétés que l'on peut progressivement éliminer au même temps que l'agglutination apparaît de plus en plus tardivement. Les lavages effectués dans une solution, une partie des bases formantelles des sérum et des autres dérivés de ces sérum, mais encore des sérum, peuvent être pris pour que, pendant des propriétés antigéniques marquées.

Pour vérifier cette hypothèse, après avoir eu recours aux mêmes procédés d'élimination, reproduisant les mêmes dérivés de culture, ces deux auteurs ont cherché à mettre en évidence et à caractériser ces dérivés antigéniques.

Pour pratiquer l'élimination microbienne, après bien des essais de filtration par diverses méthodes (fil diversement combinés : sable fin, terre d'indusoire, terre à foulon, charbon), essais se traduisant par des résultats irréguliers, ils ont eu recours aux bougies. On prit les milieux de culture privés par filtration des microbes et ne contenant plus que les principes rentrant dans la constitution du milieu de culture lui-même, avec en plus les produits provenant de la digestion et de la lyse de ces mêmes microbes, MM. PIERRE et CHÉFRET, en mettant en contact ces mêmes milieux et un sérum spécifique caractéristique, ont constaté

té la réaction générale connue se traduisant par une floculation assez abondante.

WEINBERG et BAROTTE avant eux avaient étudié la question mais seulement au point de vue bactériologique et avaient abouti à des résultats sensiblement identiques et qui sont les suivants :

a) Les filtrats de cultures de bacille paratyphique B sont capables pour des dilutions convenables de sérum spécifique de floculer en l'absence de tout élément bacillaire.

b) Ces floculats sont en général plus volumineux que dans l'agglutination obtenue avec des microbes isolés des cultures et émulsionnés en eau physiologique.

c) La floculation est rendue beaucoup plus abondante et plus rapide lorsqu'aux filtrats sur bougie on ajoute une proportion même très faible de corps microbiens homologues, vivants ou tués.

d) Enfin, dans certains filtrats l'addition de sérum normal peut également déterminer une floculation le plus souvent très faible, qui par suite n'a rien de spécifique.

C'était préciser déjà d'une façon nettement démonstrative l'opinion déjà admise de la filtrabilité des substances précipitogènes. Nous appelons substances précipitogènes ou précipitogènes tout court des matières contenues dans les cultures filtrées de bactéries et susceptibles en présence des sérums correspondants d'amener la formation de floculats spécifiques. Elles jouent par suite le rôle d'antigène au même titre que les bactéries elles-mêmes.

MM. PIETTRE et CHRÉTIEN reprenant cette étude ont cherché à vérifier pour le bacille paratyphique B les conditions de filtration de ces mêmes précipitogènes en même temps que leurs réactions biochimiques et, poussant leurs recherches plus loin que ne l'avaient fait WEINBERG et BAROTTE, ils ont essayé de vérifier la nature protidique de ces substances et de les isoler si possible par des méthodes physiques ou chimiques.

Pour le bacille paratyphique B les cultures qui semblaient convenir le mieux étaient des cultures de 2 à 6 jours. Les bougies donnant les meilleurs résultats étaient des bougies américaines, type Berkefeld, de porosité relativement élevée, mais arrêtant

dans une limite suffisamment large les bacilles du groupe étudié. Le milieu de culture employé était un bouillon, appelé bouillon H, à base de viande de veau. La préparation de ce milieu se faisait sans peptone, ni chlorure de sodium, le pH était de 7,4 mesuré par la technique électrométrique. On centrifugeait les cultures de bacille paratyphique B sur ce milieu H. Après filtration sur bougie, le liquide filtré était essayé vis-à-vis du sérum antiparatyphique B, en prenant des proportions convenables de l'un et de l'autre. On notait alors des précipités allant du simple trouble à la floculation abondante, suivie rapidement de dépôt. Ces expériences démontraient la présence des substances précipitogènes dans le filtrat sur bougie.

En vue d'examiner la composition chimique de ces substances et de les isoler, les milieux filtrés étaient traités par l'acétone, les acides et les bases. C'était l'application ici de la méthode PIETTRE et VILA, *méthode à l'acétone*, permettant d'isoler les matières protidiques des divers milieux naturels et artificiels. L'acétone à 0° précipite les albumines totales (sérum globuline, sérum albumine, myxoprotéine), les acides précipitent la sérum globuline, quant aux bases elles donnent des précipités plus ou moins complexes, elles sont d'ailleurs en dehors de la méthode sus-indiquée.

Or les filtrats ainsi traités donnaient des précipités assez abondants. On se trouvait en présence de matières protidiques, matières qui, isolées et redissoutes dans des conditions déterminées, floclaient très nettement avec le sérum spécifique correspondant. C'était la mise en évidence dans les milieux de culture de substances précipitogènes de nature protidique.

Avec plus de détails, et avec une précision permettant de déterminer le taux de la floculation, nous avons repris le travail de MM. PIETTRE et CHRÉTIEN en utilisant cette fois la bactériidie charbonneuse. La bactériidie de DAVAINÉ a été utilisée de préférence à un autre microbe parce qu'elle est très sporogène et que la taille du mycélium nous a paru supposer une plus abondante formation de produits solubles au cours de l'autolyse au sein des cultures.

A cause de l'intérêt qu'elle présente ici nous citerons la réaction bien connue d'ASCOLI. La lyse spontanée des bactéridies ou leur destruction provoquée aboutissent à la libération dans les organes infectés et leurs extraits de constituants bactériadiens, qui en présence de sérum anticharbonneux donnent une évidente précipitation. Cette réaction s'effectue comme suit : Diviser en menus fragments ou mieux pulper un gramme de rate, de foie ou de rein, ajouter 5^{cc} de solution physiologique, soumettre à l'ébullition au bain-marie pendant 5 minutes, puis filtrer la macération sur papier jusqu'à obtention d'un liquide clair. Ajouter ensuite sans mélanger du sérum antibactérien. La réaction est quasi instantanée sous forme d'un anneau de précipitation dans la zone de séparation des couches. A la décoction des produits organiques on peut avantageusement substituer une macération à froid dans du sérum physiologique phénolé ou chloroformé.

Cette réaction est intéressante et tout laisse prévoir que ces mêmes éléments microbiens solubilisés au sein des organes nous les retrouverons dans les cultures filtrées de la bactéridie.

MÉTHODES D'ÉTUDE

Des cultures de bactéridie charbonneuse sur eau peptonée ordinaire (10 pour 1.000 peptone Chapoteaut, pH = 7,4), après un développement de 15 jours à l'étuve à 37°, sont centrifugées à grande vitesse (6.000 tours à la minute, appareil Jouan de la maison Leune). Le centrifugat, séparé du culot contenant les microbes et les spores, est filtré sur bougie américaine, type Berkefeld. On vérifie par ensemencement sur les milieux habituels (eau peptonée, gélose peptonée) que le filtrat ne donne lieu à aucun développement microbien, de la sorte on a la certitude qu'il ne reste plus ni microbes, ni spores pouvant germer.

Le filtrat recueilli est séparé en quatre parties : une première partie, une vingtaine de centimètres cubes, servira à l'obtention d'une floculation directe avec du sérum anticharbonneux, flocu-

lation due comme nous l'avons dit plus haut aux substances précipitogènes en solution dans le milieu de culture charbonneux ; sur le reste, séparé en trois parties d'égale volume sensiblement, on fait agir dans les conditions qui seront indiquées plus loin l'acétone, les acides (HCl) et les alcalis (NaOH).

Les précipités obtenus sont isolés par centrifugation et lavés à deux reprises avec quelques centimètres cubes d'eau physiologique ou avec un mélange acétone-eau distillée pour le précipité acétonique, puis ils sont recueillis dans quelques centimètres cubes d'eau physiologique. Pour les précipités acides et alcalins on ajoute de l'alcali ou de l'acide en quantité juste suffisante pour les redissoudre. Le précipité acétonique (on chasse les dernières traces d'acétone sur le vide sulfurique) se redissout en grande partie dans l'eau physiologique seule. Les précipités acides et alcalins solubilisés sont ramenés à une très légère alcalinité vis-à-vis du tournesol Gallois.

Disons tout de suite que les trois réactions classiques des matières protidiques : réaction de MILLON, réaction xanthoprotéique, réaction du biuret, ont toutes été positives, confirmant ainsi la nature des substances traitées.

Les trois précipités que nous appellerons plus commodément extraits, après avoir été solubilisés comme nous venons de l'indiquer, sont mis en contact avec quelques gouttes de sérum anticharbonneux.

Nous avons utilisé pour ces expériences trois échantillons de sérum anticharbonneux : un que M. TRUCHE, de l'Institut Pasteur, a eu la très grande amabilité de nous préparer spécialement et deux autres d'origine étrangère : l'un de M. le Professeur LIGNIÈRES, l'autre de M. le Docteur GORDELLI, Directeur du Laboratoire d'Hygiène de Buenos-Aires. Le sérum du Docteur GORDELLI n'a pu être utilisé commodément en raison de son opacité un peu exagérée, due d'ailleurs à son mode de concentration à l'aide des sels. Il s'agissait en effet d'un sérum concentré par la méthode aux sels, or ces sérums sont en général plus ou moins louches en raison des modifications physiques et chimiques imposées à l'équilibre protidique du sérum, comme l'ont démontré

les recherches de M. PIERRE. Le sérum du Professeur LIGNIÈRES (sérum naturel) s'est montré assez actif, mais la présence de petites quantités de phénol nous l'a fait écarter, l'acide phénique pouvant gêner les réactions de floculation. Le sérum de M. TRUCHE nous a donné d'excellents résultats et c'est lui que nous avons utilisé pour toutes nos expériences. Nous sommes heureux d'adresser ici nos plus vifs remerciements à ces trois savants, qui nous ont fourni si aimablement de précieux moyens de travail.

Pour réaliser dans le détail les épreuves de floculation, nous mettons dans des tubes à hémolyse, propres et soigneusement séchés, 1^{cc} du filtrat des cultures ou 1^{cc} de la solution des extraits obtenus et des quantités variant de 1 à 3 gouttes de sérum spécifique. On note après un séjour de 2 heures à l'étuve à 37° les modifications survenues dans le mélange. Nous avons d'une façon constante obtenu des précipités d'intensité variable, mais toujours suffisamment nets. Nous avons eu soin de faire exactement dans les mêmes conditions des épreuves-témoin avec du sérum normal de cheval, tout au plus avons-nous obtenu dans ce dernier cas et dans quelques tubes seulement un très léger trouble, si léger que nous l'avons tenu pour négligeable. Nous avons dilué assez loin nos filtrats et nos extraits afin d'avoir une idée sur les limites de floculation sensible, celles-ci ont été suffisamment élevées allant de 1/100 à 1/200, et même davantage.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I

Dans deux fioles coniques contenant chacune 200^{cc} d'eau peptonée on ensemence la bactériodie charbonneuse provenant d'une jeune souche (6 jours) sur gélose peptonée. On laisse à l'étuve à 37° pendant 15 jours. Après quoi on suit point par point la technique indiquée. On centrifuge la culture, on filtre sur bougie Berke-

feld le liquide de centrifugation. Le filtrat est de réaction légèrement alcaline. 20 centimètres cubes environ de ce filtrat serviront à l'épreuve de floculation directe en présence de sérum anticharbonneux, le reste sera partagé en trois parties sensiblement égales pour les traitements par l'acétone, les acides et les alcalis.

Dans les tubes à hémolyse, on ajoute d'abord 1^{cc} de filtrat ou de solution d'extrait, puis les gouttes de sérum anticharbonneux. Les tubes sont ensuite agités doucement pour faciliter les contacts.

Floculation du filtrat de culture charbonneuse.

1^o Filtrat non dilué.

	Filtrat	Sérum Pasteur	Floculation
	—	—	—
Tube 1.	1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2.	1 ^{cc}	2 gouttes	++
— 3.	1 ^{cc}	3 gouttes	+++
	Sérum normal		
Tube 4.	1 ^{cc}	1 goutte	0
— 5.	1 ^{cc}	2 gouttes	0
— 6.	1 ^{cc}	3 gouttes	0

On suit aisément *de visu* la marche de la floculation, elle est presque instantanée, dans le tube 3 principalement des flocons volumineux se forment et se déposent assez rapidement. La floculation va en croissant du tube 1 au tube 3, on la facilite en laissant séjourner les tubes deux heures à l'étuve à 37°. De plus le filtrat coloré en jaune tend vers une décoloration très nette et assez rapide.

2^o Filtrat dilué :

Nous avons essayé la floculation à des dilutions de plus en

plus grandes du filtrat dans de l'eau physiologique (8,5 pour 1.000 NaCl).

	Filtrat charbonneux dilué	Sérum Pasteur	Floculation
		—	—
Tube 1	1/10 1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2	1/20 1 ^{cc}	—	+
— 3	1/50 1 ^{cc}	—	+
— 4	1/100 1 ^{cc}	—	+
— 5	1/150 1 ^{cc}	—	0
— 6	1/200 1 ^{cc}	—	0
— 7	1/300 1 ^{cc}	—	0
— 8	1/500 1 ^{cc}	—	0

A 1/100 la floculation ne se traduit que par un trouble très léger, mais il est encore suffisamment évident.

Floculation de l'extrait acétonique.

A 0°, en opérant dans la glace, on traite 100^{cc} de filtrat par 250^{cc} d'acétone. On laisse reposer 24 heures au froid (chambre à 0°). Il se forme rapidement un précipité floconneux, blanc légèrement ocre, qui se dépose lentement. Après avoir décanté la majeure partie du liquide clair, on centrifuge la partie contenant en suspension le précipité. Le culot lavé à deux reprises avec le mélange acétone (250 p.) et eau (100 p.) est repris par 10^{cc} d'eau distillée qui le dissout en majeure partie. (Il reste un faible insoluble minéral, qu'on sépare de la solution par une nouvelle centrifugation).

Cet extrait en solution aqueuse est évaporé sur le vide sulfurique pour éliminer toute trace d'acétone pouvant gêner les réactions à suivre ; le résidu est redissous dans 7^{cc}5 d'eau physiologique. Sur cette solution on procède aux essais de floculation.

1° *Extrait acétonique non dilué :*

	Extrait acétonique	Sérum Pasteur	Floculation
Tube 1.	1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2.	1 ^{cc}	2 gouttes	++
— 3.	1 ^{cc}	3 gouttes	+++
Sérum normal			
Tube 4.	1 ^{cc}	1 goutte	0
— 5.	1 ^{cc}	2 gouttes	0
— 6.	1 ^{cc}	3 gouttes	0

Les trois premiers tubes donnent un résultat positif, on obtient une abondante floculation qui commence dès le contact des deux liquides et ne fait que s'accroître par un passage de deux heures à l'étuve à 37°. La floculation va encore ici en croissant de 1 à 3. Dans les tubes témoins 4, 5, 6, il y a tout au plus un léger louche dans le dernier.

On dilue comme précédemment l'extrait acétonique dans l'eau physiologique :

2° *Extrait acétonique dilué.*

	Extrait acétonique dilué	Sérum Pasteur	Floculation
Tube 1	1/10 1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2	1/20 1 ^{cc}	—	+
— 3	1/50 1 ^{cc}	—	+
— 4	1/100 1 ^{cc}	—	+
— 5	1/150 1 ^{cc}	—	+
— 6	1/200 1 ^{cc}	—	+
— 7	1/300 1 ^{cc}	—	0
— 8	1/500 1 ^{cc}	—	0

La floculation est encore sensible à 1/200.

Floculation de l'extrait acide.

1^o Détermination de l'optimum de précipitation acide.

Par tâtonnement on cherche d'abord la quantité d'acide titré, HCl N/2, donnant le maximum de précipité dans le filtrat de la culture sur bougie. On opère de la façon suivante : soit cinq tubes à hémolyse, dans chacun d'eux on met 1^{cc} de filtrat et des quantités croissantes d'acide chlorhydrique N/2, comme l'indique le tableau suivant :

	Filtrat	HCl N/2
	—	—
Tube 1.	1 ^{cc}	0 ^{cc} 05
— 2.	1 ^{cc}	0 ^{cc} 1 = optimum
— 3.	1 ^{cc}	0 ^{cc} 15
— 4.	1 ^{cc}	0 ^{cc} 2
— 5	1 ^{cc}	0 ^{cc} 25

On laisse séjourner les tubes deux heures à l'étuve, après les avoir agités doucement pour faciliter les mélanges. On constate que l'optimum de précipitation est en 2.

On traite alors 75^{cc} de filtrat par 7^{cc}5 d'acide chlorhydrique N/2, que l'on ajoute goutte à goutte en agitant soigneusement. En même temps qu'une légère décoloration il se produit un trouble floconneux net, qu'on laisse se résoudre en petits flocons blancs grisâtres par un séjour de 24 heures en chambre froide. Comme pour le précipité acétonique on décante la partie claire et on centrifuge le dépôt. Le culot de centrifugation est détaché, lavé à deux reprises en eau physiologique, puis mis en suspension dans 10^{cc} de cette même eau salée. On ajoute une quantité de soude suffisante pour redissoudre le précipité (0^{cc}7 NaOH N/10). La solution obtenue a dès lors une réaction nettement alcaline ; sans produire une nouvelle précipitation trop sensible, on ramène à une très légère alcalinité avec un peu d'acide chlorhydrique N/10 (0^{cc}3). Cette solution est essayée vis-à-vis du sérum Pasteur.

2° *Floculation de l'extrait acide non dilué :*

	Extrait acide	Sérum Pasteur	Floculation
Tube 1.	1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2.	1 ^{cc}	2 gouttes	++
— 3.	1 ^{cc}	3 gouttes	+++
Sérum normal			
Tube 4.	1 ^{cc}	1 goutte	0
— 5.	1 ^{cc}	2 gouttes	0
— 6.	1 ^{cc}	3 gouttes	0

Dans la première série de tubes avec le sérum anticharbonneux la floculation est toujours positive et va en croissant de 1 à 3, dans la deuxième série elle est nettement négative.

3° *Floculation de l'extrait acide dilué :*

Dilution en eau physiologique comme ci-dessus :

	Extrait acide dilué	Sérum Pasteur	Floculation
Tube 1	1/10 1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2	1/20 1 ^{cc}	—	+
— 3	1/50 1 ^{cc}	—	+
— 4	1/100 1 ^{cc}	—	+
— 5	1/150 1 ^{cc}	—	+
— 6	1/200 1 ^{cc}	—	0
— 7	1/300 1 ^{cc}	—	0
— 8	1/500 1 ^{cc}	—	0

La floculation est encore nette à 1/150.

La liqueur sur laquelle nous avons fait la précipitation acide, débarrassée par une nouvelle centrifugation du précipité, se comporte comme la solution du précipité acide lui-même. Il suffit pour le voir de neutraliser l'excès d'acide et de l'essayer vis-à-vis du sérum sensible, on constate qu'il se produit une

floculation très nette. Il y a donc eu *partage des substances flocculables de l'antigène entre les deux fractions : le précipité provoqué par addition d'acide et la partie liquide débarrassée de ce même précipité.*

Floculation de l'extrait alcalin.

1° Détermination de l'optimum de précipitation alcaline :

Le filtrat de culture charbonneuse est traité par un alcali, en l'espèce NaOH N/1. Par tâtonnement on détermine la quantité minimum d'alcali donnant le maximum de précipité (deux heures à l'étuve).

	Filtrat charbonneux	NaOH N/1
Tube 1	1 ^{cc}	0 ^{cc} 05
— 2	1 ^{cc}	0 ^{cc} 1 = optimum
— 3	1 ^{cc}	0 ^{cc} 15
— 4	1 ^{cc}	0 ^{cc} 2
— 5	1 ^{cc}	0 ^{cc} 25

A 60^{cc} de filtrat on ajoute progressivement 6^{cc} de soude normale. On agite, il se forme un précipité blanc terreux, qui s'agglomère en flocons, laissant une liqueur claire surnageante. On laisse déposer pendant 24 heures au froid. On centrifuge et le culot, lavé à deux reprises avec quelques centimètres cubes d'eau physiologique, est émulsionné dans 10^{cc} de cette même eau salée.

Le précipité est dissous partiellement par 1^{cc} d'acide chlorhydrique N/10 après un contact de deux heures à l'étuve. On ramène à une très légère alcalinité avec de la soude N/10 (0^{cc}3). Une centrifugation de quelques minutes suffit à éclaircir la liqueur qui va nous servir aux essais de floculation selon la technique habituelle :

2° *Floculation de l'extrait alcalin non dilué :*

	Extrait alcalin	Sérum Pasteur	Floculation
		—	—
Tube 1.	1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2.	1 ^{cc}	2 gouttes	++
— 3.	1 ^{cc}	3 gouttes	+++
		Sérum normal	
		—	
Tube 4.	1 ^{cc}	1 goutte	0
— 5.	1 ^{cc}	2 gouttes	0
— 6.	1 ^{cc}	3 gouttes	0

La floculation est nette dans les trois premiers tubes, allant toujours en croissant de 1 à 3; elle est nulle avec le sérum normal.

3° *Floculation de l'extrait alcalin dilué :*

Dilution en sérum physiologique :

	Extrait alcalin dilué	Sérum Pasteur	Floculation
	—		—
Tube 1	1/10 1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2	1/20 1 ^{cc}	—	+
— 3	1/50 1 ^{cc}	—	+
— 4	1/100 1 ^{cc}	—	+
— 5	1/150 1 ^{cc}	—	0
— 6	1/200 1 ^{cc}	—	0
— 7	1/300 1 ^{cc}	—	0
— 8	1/500 1 ^{cc}	—	0

La floculation est encore nette à 1/100.

Le précipité provoqué par l'addition de soude contient donc des substances antigéniques ; nous avons recherché si dans la liqueur débarrassée par repos et par centrifugation de ce précipité il n'y aurait pas encore présence d'une certaine proportion de ces mêmes substances restées en dissolution. Or, en voulant neutraliser l'excès d'alcali à l'aide d'acide chlorhydrique N/2,

nous avons provoqué la formation, sans que rien ne l'ait laissé prévoir, d'un abondant précipité floconneux légèrement brunâtre.

Ce nouveau précipité a été recueilli par centrifugation, lavé à deux reprises avec de l'eau physiologique, mis comme de coutume en suspension dans 10^{cc} de cette même eau, puis finalement redissous par de petites quantités de soude N/10 jusqu'à légère alcalinité. Le soluté obtenu, centrifugé une dernière fois pour le débarrasser d'une faible partie du précipité qui ne s'était pas solubilisée, a été mis en contact avec le sérum anticharbonneux. Voici les résultats obtenus :

	Extrait alcalino-acide	Sérum Pasteur	Floculation
	—	—	—
Tube 1.	1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2.	1 ^{cc}	2 gouttes	++
— 3.	1 ^{cc}	3 gouttes	+++
		Sérum normal	
	—	—	—
Tube 4.	1 ^{cc}	1 goutte	0
— 5.	1 ^{cc}	2 gouttes	0
— 6.	1 ^{cc}	3 gouttes	0

La floculation a été encore positive dans les trois premiers tubes et négative dans les trois témoins.

La liqueur sodique initiale, débarrassée des deux précipités par centrifugation et neutralisée normalement cette fois avec de l'acide chlorhydrique N/2, flocule également avec le sérum spécifique, elle contient donc encore des substances précipitogènes.

L'étude chimique du premier précipité alcalin montre qu'il s'agit surtout de phosphates alcalino-terreux ayant entraîné une partie des protides antigéniques par le mécanisme de simple défécation utilisé pour la préparation classique des diastases. Le deuxième précipité obtenu en neutralisant la liqueur sodique paraît beaucoup plus riche en nucléoprotéides, insolubilisés par l'addition d'acide.

II

On opère sur 1.000^{cc} d'eau peptonée, répartis dans cinq fioles coniques. L'ensemencement se fait toujours avec une jeune souche de bactériodie sur gélose ordinaire. Quinze jours de développement à l'étuve à 37°.

La culture centrifugée est filtrée sur bougie Berkefeld et donne comme plus haut un filtrat limpide, ne contenant ni spores, ni bacilles. Les opérations de floculation sont conduites exactement dans les mêmes conditions que précédemment.

Floculation du filtrat charbonneux.

1° Filtrat non dilué :

	Filtrat	Sérum Pasteur	Floculation
	—	—	—
Tube 1.	1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2.	1 ^{cc}	2 gouttes	++
— 3.	1 ^{cc}	3 gouttes	+++
		Sérum normal	
	—	—	—
Tube 4.	1 ^{cc}	1 goutte	0
— 5.	1 ^{cc}	2 gouttes	0
— 6.	1 ^{cc}	3 gouttes	0

2° Filtrat dilué :

	Filtrat charbonneux dilué	Sérum Pasteur	Floculation
	—	—	—
Tube 1	1/10 1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2	1/20 1 ^{cc}	—	+
— 3	1/50 1 ^{cc}	—	+
— 4	1/100 1 ^{cc}	—	+

Tube 5	1/150 1 ^{cc}	1 goutte	+
— 6	1/200 1 ^{cc}	—	0
— 7	1/300 1 ^{cc}	—	0
— 8	1/500 1 ^{cc}	—	0

Floculation de l'extrait acétonique.

100^{cc} de filtrat sont traités à 0° par 250^{cc} d'acétone. (On ajoute l'acétone par fractions de 50^{cc} jusqu'à ce qu'il ne se forme plus de précipité).

1° Extrait acétonique non dilué :

	Extrait acétonique	Sérum Pasteur	Floculation
Tube 1	1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2	1 ^{cc}	2 gouttes	++
— 3	1 ^{cc}	3 gouttes	+++
		Sérum normal	
Tube 4	1 ^{cc}	1 goutte	0
— 5	1 ^{cc}	2 gouttes	0
— 6	1 ^{cc}	3 gouttes	0

2° Extrait acétonique dilué :

	Extrait acétonique dilué	Sérum Pasteur	Floculation
Tube 1	1/10 1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2	1/20 1 ^{cc}	—	+
— 3	1/50 1 ^{cc}	—	+
— 4	1/100 1 ^{cc}	—	+
— 5	1/150 1 ^{cc}	—	+
— 6	1/200 1 ^{cc}	—	0
— 7	1/300 1 ^{cc}	—	0
— 8	1/500 1 ^{cc}	—	0

Floculation de l'extrait acide.

1° Détermination de l'optimum de précipitation acide :

	Filtrat charbonneux	HCl N/2
Tube 1	1 ^{cc}	0 ^{cc} 05
— 2	1 ^{cc}	0 ^{cc} 1 = optimum
— 3	1 ^{cc}	0 ^{cc} 15
— 4	1 ^{cc}	0 ^{cc} 2
— 5	1 ^{cc}	0 ^{cc} 25
— 6	1 ^{cc}	0 ^{cc} 3

L'optimum de précipitation étant en 2, on ajoute à 100^{cc} de filtrat 10^{cc} d'acide chlorhydrique N/2. Le précipité est recueilli, lavé et mis en suspension dans 10^{cc} d'eau physiologique. On le solubilise avec 0^{cc}6 de soude N/10, en restant sur une très légère alcalinité.

2° Floculation de l'extrait acide non dilué :

	Extrait acide	Sérum Pasteur	Floculation
Tube 1.	1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2.	1 ^{cc}	2 gouttes	++
— 3.	1 ^{cc}	3 gouttes	+++
		Sérum normal	
Tube 4.	1 ^{cc}	1 goutte	0
— 5.	1 ^{cc}	2 gouttes	0
— 6.	1 ^{cc}	3 gouttes	0

3° Floculation de l'extrait acide dilué :

	Extrait acide dilué	Sérum Pasteur	Floculation
Tube 1	1/10 1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2	1/20 1 ^{cc}	—	+

Tube 3	1/50 1 ^{cc}	1 goutte	+
— 4	1/100 1 ^{cc}	—	+
— 5	1/150 1 ^{cc}	—	+
— 6	1/200 1 ^{cc}	—	+
— 7	1/300 1 ^{cc}	—	0
— 8	1/500 1 ^{cc}	—	0

La liqueur mère, débarrassée du précipité acide par centrifugation, une fois neutralisée, donne encore une floculation nette.

Floculation de l'extrait alcalin.

1^o Détermination de l'optimum de précipitation alcaline

	Filtrat	NaOH N/1
Tube 1	1 ^{cc}	0 ^{cc} 05
— 2	1 ^{cc}	0 ^{cc} 1
— 3	1 ^{cc}	0 ^{cc} 15 = optimum
— 4	1 ^{cc}	0 ^{cc} 2
— 5	1 ^{cc}	0 ^{cc} 25
— 6	1 ^{cc}	0 ^{cc} 3

On traite donc 85^{cc} de filtrat charbonneux initial par 12^{cc}75 de soude normale. Le précipité, isolé par centrifugation, est lavé et mis en suspension dans 10^{cc} d'eau physiologique. On le solubilise en grande partie par 1^{cc}1 d'acide chlorhydrique N/10, on ramène à une alcalinité très légère avec la liqueur sodique N/10. Nous ne ferons ici nos essais de floculation que sur l'extrait non dilué.

2^o Floculation de l'extrait alcalin non dilué :

	Extrait alcalin	Sérum Pasteur	Floculation
Tube 1.	1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2.	1 ^{cc}	2 gouttes	++
— 3.	1 ^{cc}	3 gouttes	+++

		Sérum normal	
Tube 4.	1 ^{cc}	1 goutte	0
— 5.	1 ^{cc}	2 gouttes	0
— 6.	1 ^{cc}	3 gouttes	0

Le centrifugat alcalin, neutralisé par HCl N/2, précipite avec le même sérum spécifique, c'est donc que la *précipitation alcaline n'a entraîné qu'une partie des substances antigéniques*. Comme précédemment, en neutralisant la liqueur débarrassée du précipité alcalin, on a obtenu un nouveau précipité, qui, dissous en grande partie avec la quantité minimum de soude N/10, donne une floculation nette avec le sérum anticharbonneux.

III

Au lieu de *milieux liquides*, nous avons eu recours à des *milieux solides* et de préférence à la gélose peptonée. Les ensemencements ont été faits sur cette même gélose répartie en cinq boîtes de Roux. Les cultures se sont développées pendant 15 jours à l'étuve à 37°, jusqu'à obtenir une sporulation presque complète. Dans ces conditions l'autolyse des corps microbiens a été beaucoup plus abondante que sur nos milieux liquides, moins favorables, nous l'avons vu, à la formation des spores. C'est un moyen d'obtenir des solutions plus riches en substances protidiques jouant le rôle d'antigène.

Après les quinze jours d'étuve, à l'aide d'un pinceau et d'eau physiologique stériles, on détache de la surface du milieu nutritif le revêtement microbien, on rince à plusieurs reprises pour enlever toute la culture très riche en spores. En opérant avec précaution, on parvient assez aisément à ne pas entraîner de parcelles de gélose.

La suspension microbienne, formant un volume de 200^{cc}, est mise à l'étuve à 37° pendant deux heures, puis à la chambre froide pendant 24 heures. On centrifuge ensuite pendant trente

minutes à la vitesse de 6.000 tours à la minute pour séparer les éléments microbiens et les spores. La liqueur à peine trouble est filtrée sur bougie Berkefeld. Il passe un liquide clair, jaune ambré, dont on contrôle la pureté par ensemencement sur gélose et sur eau peptonée.

C'est ce filtrat qui va nous servir, comme précédemment, à réaliser une floculation spécifique avec du sérum anticharbonneux et aux diverses précipitations à l'aide d'acétone et d'acide. Nous laisserons de côté l'action des alcalis, dont le précipité est plus ou moins complexe et accompagné d'une trop grande proportion de matières minérales. On adopte une technique analogue à celles déjà décrites.

Floculation du filtrat charbonneux.

1° Filtrat non dilué :

	Filtrat	Sérum Pasteur	Floculation
Tube 1.	1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2.	1 ^{cc}	2 gouttes	++
— 3.	1 ^{cc}	3 gouttes	+++
		Sérum normal	
Tube 4.	1 ^{cc}	1 goutte	0
— 5.	1 ^{cc}	2 gouttes	0
— 6.	1 ^{cc}	3 gouttes	0

La floculation se montre particulièrement abondante sur les trois premiers tubes, elle va toujours en croissant de 1 à 3. Dans le troisième tube on voit se former de beaux flocons très apparents et qui se rassemblent rapidement.

2° Filtrat dilué :

	Filtrat dilué	Sérum Pasteur	Floculation
Tube 1	1/10 1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2	1/20 1 ^{cc}	—	+

Tube 3	1/50	1 ^{cc}	1 goutte	+
— 4	1/100	1 ^{cc}	—	+
— 5	1/150	1 ^{cc}	—	+
— 6	1/200	1 ^{cc}	—	0
— 7	1/300	1 ^{cc}	—	0
— 8	1/500	1 ^{cc}	—	0

Floculation de l'extrait acétonique.

95^{cc} de filtrat charbonneux sont traités par deux fois et demi leur volume d'acétone. Apparemment la quantité de substance précipitée n'est pas sensiblement beaucoup plus abondante que dans nos premiers essais sur milieux liquides.

1^o Extrait acétonique non dilué :

	Extrait acétonique	Sérum Pasteur	Floculation
Tube 1.	1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2.	1 ^{cc}	2 gouttes	++
— 3.	1 ^{cc}	3 gouttes	+++
		Sérum normal	
Tube 4.	1 ^{cc}	1 goutte	0
— 5.	1 ^{cc}	2 gouttes	0
— 6.	1 ^{cc}	3 gouttes	0

La floculation est ici encore particulièrement active et nette : nous obtenons un beau précipité floconneux, surtout en 2 et 3.

2^o Extrait acétonique dilué :

	Extrait acétonique dilué	Sérum Pasteur	Floculation
Tube 1	1/10 1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2	1/20 1 ^{cc}	—	+
— 3	1/50 1 ^{cc}	—	+

Tube 4	1/100 1 ^{cc}	1 goutte	+
— 5	1/150 1 ^{cc}	—	+
— 6	1/200 1 ^{cc}	—	+
— 7	1/300 1 ^{cc}	—	0
— 8	1/500 1 ^{cc}	—	0

Floculation de l'extrait acide.

1^o Détermination de l'optimum de précipitation :

	Filtrat charbonneux	HCl N/2
Tube 1	1 ^{cc}	0 ^{cc} 05
— 2	1 ^{cc}	0 ^{cc} 1
— 3	1 ^{cc}	0 ^{cc} 15
— 4	1 ^{cc}	0 ^{cc} 2
— 5	1 ^{cc}	0 ^{cc} 25 = optimum
— 6	1 ^{cc}	0 ^{cc} 3

Nous additionnons 100^{cc} de filtrat de 25^{cc} d'acide chlorhydrique N/2. On obtient un précipité blanc brunâtre, un peu plus abondant que dans nos expériences précédentes, qui, séparé et lavé, est mis en suspension dans 10^{cc} d'eau physiologique. Ce même précipité est redissous en grande partie par 1^{cc} de soude N 10, on ramène à une faible alcalinité pour les essais de floculation (0^{cc}4 HCl N/10).

2^o Floculation de l'extrait acide non dilué :

	Extrait acide	Sérum Pasteur	Floculation
Tube 1.	1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2.	1 ^{cc}	2 gouttes	++
— 3.	1 ^{cc}	3 gouttes	+++
		Sérum normal	
Tube 4.	1 ^{cc}	1 goutte	0
— 5.	1 ^{cc}	2 gouttes	0
— 6.	1 ^{cc}	3 gouttes	0

Signalons un très faible louche dans le tube 6, mais nullement comparable à la belle floculation obtenue avec le sérum spécifique.

3^o *Floculation de l'extrait acide dilué :*

	Extrait acide dilué	Sérum Pasteur	Floculation
Tube 1	1/10 1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2	1/20 1 ^{cc}	—	+
— 3	1/50 1 ^{cc}	—	+
— 4	1/100 1 ^{cc}	—	+
— 5	1/150 1 ^{cc}	—	+
— 6	1/200 1 ^{cc}	—	0
— 7	1/300 1 ^{cc}	—	0
— 8	1/500 1 ^{cc}	—	0

* * *

De ces trois séries d'expériences se dégage cette conclusion très nette que le filtrat des cultures, aussi bien en milieu liquide qu'en milieu solide, plus abondamment dans ce dernier cas, contient en dissolution des *substances antigéniques de nature protidique, provenant sans nul doute de l'autolyse microbienne, substances qui réagissent sur le sérum spécifique correspondant par une floculation plus ou moins importante suivant les concentrations*. Par comparaison les sérums normaux ne donnent qu'une floculation insignifiante se manifestant tout au plus par un trouble extrêmement faible.

Le premier fait qui frappe dans ces expériences, c'est une différence extrêmement nette séparant cette *précipitation* de la *véritable agglutination bacillaire*. En effet, tandis que l'agglutination bactérienne en général se produit, comme on le sait, avec assez de lenteur et se poursuit plus longtemps, la précipi-

tation ou mieux la floculation à l'aide d'extraits autolytiques est très rapide et presque immédiate.

Cette floculation, en effet, apparaît presque aussitôt après l'addition du sérum sous forme d'un trouble général plus ou moins abondant, qui se résout bientôt en fines particules, puis en flocons qui se réunissent et qui tombent. On suit facilement à la loupe ou au microscope les progrès de la floculation. Ce sont là, semble-t-il, les véritables caractères d'une réaction physico-chimique, bien plus que d'une réaction biologique, comme l'entendent les bactériologistes.

Ces substances protidiques sont d'ailleurs très riches en phosphore et s'il s'agit d'un mélange de protides proprement dits, ce sont des protides complexes, surtout des nucléoprotéides, qui dominent très largement. D'autre part, il ne semble pas nécessaire d'admettre la présence d'une nouvelle matière, d'une « floculine », comme le disent WEINBERG et BAROTTE.

MM. PIETTRE et CHRÉTIEN, en étudiant les mêmes phénomènes sur les bacilles paratyphiques B, ont déjà conclu dans ce sens et ils rapprochent ces floculations des phénomènes de séroprécipitation, elles apparaissent comme des phénomènes physico-chimiques analogues, ce sont des réactions de protides entre eux.

Ces observations sur la bactériodie charbonneuse apportent d'autre part une confirmation nouvelle à l'opinion des deux auteurs sus-indiqués, à savoir : l'intervention dans les phénomènes classiques de l'agglutination de ces substances protidiques mises en liberté dans les cultures, substances protidiques venant réagir selon un mode physico-chimique sur les sérums spécifiques et plus particulièrement sur les anticorps que contiennent ces sérums. Dans l'agglutination bactérienne nous ferons donc rentrer dans la constitution de l'antigène ces mêmes substances qui dans les cultures viennent toujours plus ou moins se fixer par adhésion physique sur les microbes vivants, ces microbes vivants au contact d'un sérum spécifique seront entraînés, agglutinés par suite de la réaction antigène-anticorps.

TROISIÈME PARTIE

EXTRAITS BACILLAIRES

APPLICATION A LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE

Nous venons de mettre en évidence l'existence, à l'état de dispersion dans les liquides de cultures microbiennes, de substances spécifiques flocculant très nettement au contact des sérums correspondants. Nous avons dit que ces substances provenaient de l'autolyse des microbes au sein des cultures et qu'elles faisaient probablement partie intégrante de la constitution des corps microbiens eux-mêmes.

Maurice NICOLLE met lui aussi à la base du phénomène d'agglutination une substance issue du microbe, mais restant pour la plus grande partie au niveau de la membrane. Cette fixation à la surface des éléments microbiens de substances antigéniques a été mise en évidence par la possibilité de les entraîner par des lavages répétés dans des conditions déterminées. MM. PIETTRE et CHRÉTIEN, nous l'avons déjà indiqué, ont précisément établi cette possibilité dans leur important travail sur la biochimie de l'agglutination. Ils ont pris des cultures jeunes de bacilles paratyphiques B et ils ont isolé ces bacilles de leurs milieux de culture par centrifugation. Après les avoir mis en suspension dans l'eau physiologique, ils ont procédé à plusieurs lavages avec cette même eau salée d'abord légèrement acidulée, puis alcaline et finalement neutre. Les bacilles lavés ont été remis en suspension homogène et soumis à une épreuve d'agglutination parallèlement à une suspension de bacilles non lavés. On a constaté alors que si les bacilles non lavés étaient agglutinés à un certain taux, les

autres l'étaient à un taux 7, 8 et même 10 fois moins élevé. Voici à titre d'exemples les résultats obtenus dans trois séries d'expériences :

Taux de l'agglutination	
Bacilles non lavés	Bacilles lavés
1/35000	1/4000
1/20000	1/1500
1/50000	1/8000

D'autre part ces auteurs ont montré que dans les eaux de lavage, recueillies soigneusement et neutralisées exactement, on pouvait séparer des protides capables de flocculer en présence d'un sérum spécifique.

L'hypothèse de Maurice NICOLLE se trouve ainsi justifiée, mais sans vouloir affirmer que la plus grande partie des substances en question soient localisées, fixées à la surface des corps microbiens, nous dirons plus simplement qu'elles se trouvent réparties, et dans les milieux de culture à l'état de dispersion micellaire, et à la surface des bacilles vivants où elles sont retenues par simple adhésion physique.

Quant à l'origine microbienne de ces substances spécifiques, en 1914, à la suite de recherches provoquées par les épidémies de paratyphoïde de Pont-à-Mousson et de Chollet, M. PIETTRE, en collaboration avec le D^r BIDAULT, mettait déjà en avant leur identité, leur similitude avec les protides constituant la substance du bacille paratyphique de GAETNER. Pour vérifier son hypothèse M. PIETTRE attaquait des bacilles paratyphiques, après les avoir soumis à des lavages répétés, par des alcalis étendus. Or les liqueurs basiques obtenues, neutralisées avec soin à l'aide d'acide titré, mettaient en liberté des protides complexes, capables de jouer le rôle de véritables précipitogènes en présence de sérum antityphique B. L'attaque par la soude pouvait s'interpréter comme une autolyse provoquée. Signalons ici l'application de ces principes dans la préparation des vaccins MAUTÉ, vaccins

obtenus par solubilisation des éléments microbiens à l'aide de la soude.

Continuant nos recherches sur le bacille charbonneux, nous avons appliqué la technique de M. PIETTRE à ce microbe, nous avons essayé de solubiliser artificiellement et de mettre en évidence les substances rencontrées précédemment dans les liquides de culture.

ATTAQUE DES CORPS MICROBIENS EN SOLUTION ALCALINE FAIBLE

Le principe de la méthode de M. PIETTRE tient en quelques lignes : des suspensions microbiennes en eau distillée sont traitées par des quantités croissantes de soude titrée. Après action alcaline, on sépare par centrifugation les bacilles non attaqués ou les restes de bacilles, si l'attaque n'a été que partielle. La liqueur de centrifugation est filtrée sur bougie Berkefeld, le filtrat contenant en dissolution le produit d'attaque des microbes est alors soumis à une neutralisation ménagée de l'alcali par de l'acide chlorhydrique titré. Il se produit une floculation plus ou moins abondante de protides complexes, parmi lesquels dominent les nucléoprotéides que l'on sait constituer en majeure partie la substance des éléments bactériens. L'attaque par la soude, menée de la sorte, équivaut en réalité à une autolyse plus active et sans doute plus poussée que celle qui se poursuit naturellement dans toute culture microbienne.

Cette même autolyse chimique, outre son application au bacille paratyphique par M. PIETTRE, a été ensuite appliquée par ce dernier, en collaboration avec M. CIRÉTIEN, aux bacilles tuberculeux d'origine bovine et aviaire.

Au cours de nos expériences sur la bactériodie charbonneuse, une fois les formes mycéliennes isolées, on a soin de les débarrasser par lavage et centrifugations successives des substances protidiques solubilisées ou mises en suspension par les phéno-

mènes d'autolyse. En ce qui concerne les bacilles paratyphiques, ces lavages sont effectués successivement en milieux acides et alcalins. Pour la bactérie de DAVAINÉ, enveloppée d'une épaisse gaine unie, lisse et dépourvue de prolongements protoplasmiques ou cils facilitant l'adhésion physique des substances précipitogènes d'origine autolytique, il nous a paru suffisant d'opérer à l'aide d'eau physiologique seule et de renouveler plusieurs fois ces lavages aqueux.

L'attaque doit être conduite avec la plus grande douceur en utilisant des solutions diluées d'alcali, cela afin de la faire équivaloir autant que possible à une simple solubilisation des substances constituant les corps microbiens, solubilisation n'altérant pas sensiblement ces substances et respectant leurs propriétés biologiques.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Pour ne pas surcharger cette exposition, nous décrirons en détail une expérience choisie parmi les quatre exécutées au cours de ces recherches.

L'expérience comprend trois phases :

1^o L'attaque alcaline proprement dite ;

2^o La précipitation par les acides des substances protidiques solubilisées par les alcalis, la redissolution de ces précipités en liqueurs aqueuses en vue de recherches biologiques et en particulier de la floculation avec du sérum anticharbonneux spécifique ;

3^o L'étude de cette floculation et des constituants chimiques de la bactérie.

I. — Attaque alcaline proprement dite.

Deux fioles d'Erlenmeyer contenant chacune 500^{cc} d'eau peptonée (pH = 7,4) sontensemencées avec une jeune souche

de bactériodie charbonneuse sur gélose. On laisse 4 jours à l'étuve, au bout de ce temps la culture est constituée de filaments microbiens assez longs avec des bâtonnets relativement peu sporulés.

On procède à la centrifugation de l'ensemble des liquides de culture. Le culot microbien est suffisamment abondant, il est rassemblé et émulsionné dans 100^{cc} d'eau physiologique, puis centrifugé à nouveau. On le réémulsionne dans une quantité égale d'eau salée, ce deuxième lavage achevé, on en fait un troisième, puis un quatrième et dernier. Ainsi lavés les microbes sont recueillis et mis finalement en suspension dans 20^{cc} d'eau distillée.

On rassemble cette émulsion dans une petite fiole d'Erlenmeyer stérile, fermée d'un tampon d'ouate et capuchonnée, puis on la traite de la manière suivante par des doses progressives de soude titrée (N/10 d'abord, normale ensuite).

Attaque sodique progressive :

1 ^{er} jour	émulsion + 5 ^{cc} NaOH N/10, étuve 37°-24 h.
2 ^e jour	— + 5 ^{cc} NaOH N/10 —
3 ^e jour	— + 1 ^{cc} NaOH N —
4 ^e jour	— + 2 ^{cc} NaOH N —
5 ^e jour	— + 1 ^{cc} NaOH N —

soit au total 5^{cc} de NaOH normale pour 20^{cc} d'émulsion microbienne. Avant chacune de ces additions d'alcali, on examine avec soin l'état de la bactériodie, soit à l'état frais (entre lame et lamelle), soit après les colorations d'usage (gram ou colorations simples : bleu de méthylène, safranine). On contrôle d'autre part la vitalité des éléments bactériadiens par des ensemencements sur gélose. Voici les indications que nous avons recueillies :

Dès les premiers jours *l'attaque par la soude* amène une légère altération du corps microbien : des espaces clairs, des granulations commencent à apparaître, la bactériodie retient déjà moins bien les colorants. A mesure que les doses de soude augmentent, ces altérations morphologiques, portant principalement sur les espaces clairs et les granulations protoplasmiques, s'accroissent de plus en plus. Mais alors que dans le cas des microbes du type

paratyphique B par exemple, des doses de soude N/10 assez faibles suffisent pour amener une destruction presque totale, la bactériodie charbonneuse, que l'on est convenu en bactériologie de considérer comme très délicate, capable même d'être détruite, lysée par l'eau distillée seule, nous est apparue au contraire comme très résistante. Elle l'est plus que le bacille de KOCH lui-même, qui sous l'influence de l'attaque sodique (M. PIETTRE) s'amincit peu à peu, diminue d'épaisseur jusqu'à destruction quasi-complète. Cette résistance aurait pu être prévue en raison de l'épaisse capsule qui entoure la bactériodie, capsule dont la nature est inconnue (protides condensés du type chimique de la Kératine). En fait, quand on suit avec soin les progrès de l'attaque sodique, on constate d'abord dans l'élément microbien l'apparition d'espaces clairs, puis sans doute par contraste la présence de granulations foncées représentant des parties moins altérées. Plus tard le bâtonnet s'éclaircit et semble plus ou moins vidé de sa substance, la gaine capsulaire devient plus nette, plus épaisse, comme soufflée. Enfin, au terme de l'expérience nombre de microbes ne représentent plus qu'un ensemble de petites granulations et la membrane d'enveloppe apparaît éclatée, déchiquetée.

Comme nous l'avons déjà dit, l'aptitude à prendre les couleurs s'atténue et va en diminuant au fur et à mesure de l'attaque. Les colorants se fixent à peine et d'une façon très inégale, la safranine notamment teint les restes bacillaires non plus en rouge mais en jaune clair.

D'autre part, tant que dure le séjour à l'étuve, on voit l'opacité de la suspension bacillaire s'atténuer progressivement, indice d'une solubilisation graduelle des éléments microbiens. Après agitation les restes bactériens qui ont résisté à l'attaque tombent rapidement au fond du liquide, sous l'aspect d'une masse visqueuse presque translucide.

La *vitalité* de la bactériodie a été suivie pendant toute la durée de l'attaque sodique. Journallement avant chaque nouvelle addition d'alcali, nous avons pratiqué des ensemencements sur des milieux de culture appropriés : gélose peptonée et eau peptonée. *Tout pouvoir végétatif est supprimé seulement le qua-*

trième jour, après action de 4^{es} de soude normale. Il est bien possible d'ailleurs que la vitalité prolongée de la bactéridie charbonneuse soit plutôt due non pas au mycélium moins résistant et en tout cas plus rapidement tué, mais à la spore fortement protégée par une coque épaisse de nature chytineuse ou peut-être même constituée par des matières azotées ou cellulosiques très condensées. M. PIETTRE base cette dernière hypothèse sur la nature peut-être cellulosique de la coque de la spore sur la propriété optique de cette membrane. La très grande réfringence de la spore ou graine se concilie en effet difficilement avec la conception classique d'une condensation de protides (nucléoprotéides surtout). En général, ces condensations se manifestent au microscope par une plus grande absorption de rayons lumineux. Des recherches longues et délicates pourront seules apporter la solution de ce problème très ardu mais cependant accessible en s'adressant de préférence à la bactéridie charbonneuse, qui sporule très abondamment et avec une très grande facilité.

L'attaque de l'émulsion bactérienne, soumise comme nous venons de le voir à des doses relativement élevées de soude sans atteindre une destruction complète, est arrêtée le sixième jour. A ce moment la suspension bacillaire voit son opacité très fortement diminuée et les bâtonnets apparaissent presque vidés de leur contenu. Nous avons jugé inutile d'aller plus loin. L'émulsion est alors centrifugée à fond, on ne peut guère, en raison de son alcalinité assez forte, recourir utilement à la filtration sur bougie.

Nous obtenons ainsi une liqueur presque claire, à peine louche, et un léger culot constitué par les restes microbiens inattaqués et qu'on néglige en raison de son peu d'importance.

II. — Précipitation et redissolution des substances protidiques d'origine microbienne.

La liqueur précédente est alors neutralisée goutte à goutte par de l'acide chlorhydrique N/2.

Dès la première goutte on observe la formation d'un louche abondant, puis à mesure qu'on ajoute l'acide il se forme un précipité floconneux blanchâtre. Avant la neutralisation exacte de la soude on laisse déposer. Le précipité volumineux formé de gros flocons tombe assez rapidement, laissant en surface un liquide alcalin qu'on sépare par centrifugation. Afin de le neutraliser complètement, ce liquide est additionné à nouveau d'acide N/2, mais il ne se forme plus de précipité, toutes les substances solubilisées par la soude ont donc été déjà précipitées.

Le culot de centrifugation est recueilli dans 20^{cc} d'eau physiologique, on y ajoute progressivement de très petites quantités de soude normale pour le dissoudre. Cette solubilisation est faite en plusieurs fois et après chaque addition d'alcali, on laisse en contact trente minutes à l'étuve pour faciliter la dispersion des protides bactériens. Il faut environ 3^{cc} de soude normale pour obtenir cette dispersion. On obtient une liqueur à peine louche, qu'on clarifie par une dernière centrifugation et qui, amenée à un volume de 30^{cc} avec de l'eau salée isotonique, va pouvoir nous servir aux essais de floculation avec du sérum anticharbonneux.

III. — Floculation de l'extrait microbien.

Nous avons toujours utilisé le sérum de M. TRUCHE qui nous a donné entière satisfaction. Mais ici au lieu de prendre 1, 2 ou 3 gouttes de sérum spécifique pour 1^{cc} de filtrat ou d'extrait, nous avons fait l'inverse, nous avons pris 1^{cc} de sérum et 1, 2 ou 3 gouttes d'extrait. Voici le détail de nos expériences :

1^o Floculation de l'extrait microbien non dilué :

	Sérum Pasteur	Extrait microbien	Floculation
Tube 1.	1 ^{cc}	1 goutte	+
— 2.	1 ^{cc}	2 gouttes	++
— 3.	1 ^{cc}	3 gouttes	+++

Sérum normal

Tube 4.	1 ^{cc}	1 goutte	0
— 5.	1 ^{cc}	2 gouttes	0
— 6.	1 ^{cc}	3 gouttes	0

En 1 il y a un louche, en 2 des flocons très nets apparaissent, en 3 ils sont de plus en plus abondants et se rassemblent assez rapidement. On lit les résultats après 2 heures d'étuve.

L'addition d'extrait microbien dans le sérum spécifique s'accompagne d'une faible décoloration de celui-ci : jaune ambré, au début, ce sérum perd sa coloration proportionnellement à la concentration en extrait. Le flocculat entraîne avec lui une partie des pigments sériques comme dans une véritable défécation. Ce phénomène souligne donc nettement la formation d'un flocculat spécifique.

Avec le sérum normal, au contraire, la décoloration est beaucoup moins accentuée et plus longue à se produire. Il se produit un très faible louche, qui à l'étuve s'affaiblit quelque peu, mais à aucun moment on ne note de floculation et encore moins un dépôt quelconque.

2^o *Floculation de l'extrait microbien dilué :*

Nous avons essayé de mesurer l'activité du pouvoir précipitogène de l'extrait microbien. Les essais précédents ont montré que la floculation débutait avec 1 goutte de l'extrait pour 1^{cc} de sérum, c'est-à-dire à une dilution voisine de 1/20. Nous avons suivi les réactions des dilutions de plus en plus grandes de cet extrait dans du sérum physiologique.

Sérum Pasteur	Extrait dilué	Floculation
Tube 1 19 gouttes	au 1/2 1 goutte (dil. 1/40)	+
— 2 19 gouttes	au 1/5 1 goutte (dil. 1/100)	+
— 3 19 gouttes	au 1/7 1 goutte (dil. 1/140)	0
— 4 19 gouttes	au 1/10 1 goutte (dil. 1/200)	0
— 5 19 gouttes	au 1/15 1 goutte (dil. 1/300)	0

En 1 il y a un louche sensible, en 2 il est juste perceptible. Les résultats obtenus dans trois autres essais rigoureusement identiques ont concordé avec l'expérience-type dont nous venons de donner les détails, seule la mesure de l'activité du pouvoir précipitogène a quelque peu varié : deux fois 1 p. 100, 1 fois 1 p. 40.

Ces constatations répétées à plusieurs reprises montrent donc la richesse des extraits obtenus en substances précipitogènes d'origine microbienne et solubilisées par la soude.

On peut observer également ces mêmes réactions, mais à un moindre degré, dans les premières eaux de lavage des éléments microbiens avant l'attaque sodique.

Pour donner une idée de la teneur de l'extrait microbien en matières minérales, nous avons opéré sur 30^{cc} d'une solution sodique, ces 30^{cc} provenant de la réunion des deux solutés résiduels de deux expériences.

Le poids de l'extrait sec obtenu a été de 0 gr. 3400, contenant après calcination 0 gr. 1712 de cendres, c'est-à-dire 50,35 %, la différence, soit 0 gr. 17, étant probablement due en majeure partie à ces matières protidiques faisant partie de la substance bacillaire et que la soude a solubilisées.

* * *

De ces expériences il résulte que les extraits microbiens obtenus possèdent des propriétés précipitantes très nettes vis-à-vis du sérum anticharbonneux. Nous pouvons donc admettre une communauté d'origine entre les substances précipitogènes et les constituants mêmes des bactéries. L'attaque alcaline ne peut cependant faire autrement que de les modifier quelque peu, tout en libérant ces substances (beaucoup plus en tous cas que l'action autolytique naturelle dans les cultures).

Ayant mis en évidence ces précipitogènes dans nos autolysats, nul doute qu'ils ne proviennent de la même substance bacillaire.

QUATRIÈME PARTIE

LE DÉVELOPPEMENT DE LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE SUR LES MILIEUX DE CULTURE pH — ACIDITÉ ET ALCALINITÉ DE CES MILIEUX

Dans ce chapitre ont été étudiées les limites de pH (maximum et minimum) entre lesquelles la bactéridie charbonneuse peut se développer ; nous avons essayé en outre de déterminer les variations de pH dues au développement microbien dans un milieu. Parallèlement à cette étude nous avons suivi par les méthodes volumétriques habituelles les variations de l'acidité et de l'alcalinité totales, nous avons pu avoir ainsi une idée sur le pouvoir fermentaire du microbe. Comme milieu de culture nous avons pris un milieu aussi simple que possible : l'eau peptonée à 10 p. 1.000 (peptone Chapoteaut). Les milieux solides auraient été évidemment bien préférables, ils nous auraient permis d'avoir une sporulation très active et d'observer ainsi très utilement l'influence du pH sur la production des spores. Malheureusement ces essais ne pouvaient être faits pratiquement que sur des milieux liquides, peu favorables, comme nous l'avons vu plus haut, à une active sporulation et souvent même franchement défavorables.

MÉTHODES D'ÉTUDE

La bactéridie charbonneuse est ensemencée sur plusieurs séries de tubes contenant chacun 10^{cc} d'eau peptonée. Une pre-

mière série contient des quantités croissantes d'acide chlorhydrique titré — une deuxième série des volumes également croissants de soude titrée de manière à avoir toutes une gamme de pH donnée. Après deux jours d'étuve on note l'importance du développement microbien en relation avec la concentration en ions H du milieu au moment de l'ensemencement.

Pour étudier les variations de pH, les cultures à la sortie de l'étuve sont légèrement neutralisées et centrifugées quelques instants, sur la partie claire on détermine la concentration en ions H ou OH. Nos déterminations colorimétriques sont faites par colorimétrie à après la méthode de CLARK et LUES. Il faut éviter, comme le recommande M. BEA, de diluer par un moyen quelconqué les milieux ensemencés et par suite plus ou moins troubles, dont on veut déterminer le pH. Cette dilution serait susceptible d'amener des variations non imputables à la culture, surtout si on opérait avec du papier qui est presque toujours alcalin.

Nous ne voulons pas exposer ici la théorie de la mesure de la concentration en ions Hydrogène par la méthode colorimétrique de CLARK et LUES, méthode que l'on trouve exposée aujourd'hui dans les ouvrages classiques. Nous en rappellerons seulement les principes.

Cette méthode comporte, comme son nom l'indique, l'emploi d'indicateurs colorés : c'est-à-dire de reactifs de teinte variable suivant la concentration du milieu en H ou OH. Elle comporte aussi des solutions étalons choisies de manière à présenter un titre connu d'ions H, et, pour éviter toute variation importante ou brusque, on prépare ces solutions avec des substances tampons, c'est-à-dire des substances qui ont la propriété de maintenir la concentration voulue, tout en amortissant les variations ultérieures consécutives à l'addition de liquides de concentration ionique différente. Ces tampons sont représentés surtout par les sels formés d'un acide faible neutralisé en partie par une base forte (il en existe d'autres : glycocolle, protéides, etc.). A ces tampons on ajoute un acide ou un alcali en quantité déterminée pour avoir un pH donné. Ces mélanges peuvent être choisis en proportions telles qu'ils puissent con-

virer une portion plus ou moins importante de l'échelle des pH.

Si, on ajoute chacun des indicateurs colorés en quantité calculée aux mélanges tampons correspondants à sa zone de virage, on obtient une série d'échelles colorées à teintes dégradées. Les échelles, une fois construites, permettent par la comparaison des teintes obtenues avec les milieux à essayer d'en déterminer la concentration en ions H ou OH.

Pour établir ces échelles il faut tout d'abord préparer les solutions suivantes :

1° Une solution de HCl (N/5). Cette solution est préparée par la méthode pondérale de VIALARD (à l'état de chlorure d'ammonium).

2° Une solution de soude N/5. Cette solution est faite avec de l'eau bidistillée privée de CO_2 par ébullition et de la soude privée de carbonate. Cette soude est obtenue en dissolvant 100 grammes de soude pure du commerce dans 100 grammes d'eau pure. Le carbonate de soude est insoluble dans la soude à cette concentration. On laisse reposer quelque temps et on prépare après decantation du liquide clair, et approximativement, la solution de soude N/5 ; elle est exactement ajustée par rapport à la solution d'HCl N/5 précédente et conservée en flacons paraffinés.

3° Une solution N/5 de phtalate acide de potassium. Dissoudre 30 grammes 828 de phtalate acide pur et amener à un litre avec de l'eau bidistillée dans une fiole jaugée.

4° Une solution N/5 de phosphate monopotassique. Dissoudre 27 grammes 231 de PO_4KH_2 pur, séché à 100°, et amener à 1.000^{cc}.

5° Une solution d'acide borique N/5. Dissoudre 12 grammes 4042 d'acide borique, séché dans le vide sur du chlorure de calcium ou de l'acide sulfurique, et amener à un litre.

Ces diverses solutions servent à obtenir des solutions étalons, dont nous donnons ci-après les formules (Pages 58 et 59).

Solution tampon	KCl $\frac{N}{5}$	...	50 ^{cc} , ajouter HCl $\frac{N}{5}$..	97 ^{cc} , compléter à 200 ^{cc} avec de l'eau bidistillée, 1	pH
			64, 5		1.2
		"	44, 5		1.4
		"	26, 3		1.6
		"	16, 6		1.8
		"	10, 6		2
		"	6, 7		2.2
Solution tampon phthalate acide de K $\frac{N}{5}$		50 ^{cc} , ajouter HCl $\frac{N}{5}$..	46 ^{cc} 7		2.2
		"	39, 6		2.4
		"	32, 9.5		2.6
		"	26, 6.2		2.8
		"	20, 3.2		3
		"	14, 7		3.2
		"	9, 9		3.4
		"	5, 97		3.6
		"	2, 63		3.8
Solution tampon phthalate acide de K $\frac{N}{5}$		50 ^{cc} , ajouter NaOH $\frac{N}{5}$	0 ^{cc} 4.		4
		"	3, 7		4.2
		"	7, 5		4.4
		"	12, 1.5		4.6
		"	17, 7		4.8
		"	23, 8.5		5
		"	29, 9.5		5.2
		"	35, 4.5		5.4
		"	39, 8.5		5.6
		"	43		5.8
		"	45, 4.5		6
		"	47		6.2

Solution tampon phosphate acide de $K \frac{N}{5}$	$\frac{N}{5}$	50 ^{cc} , ajouter NaOH	$\frac{N}{5}$	3 ^{cc} 72,	compléter à 200 ^{cc} avec eau bidistillée,	pH
—	—	»	5, 77	—	—	5, 8
—	—	»	8, 6	—	—	6, 0
—	—	»	12, 6	—	—	6, 2
—	—	»	17, 8	—	—	6, 4
—	—	»	23, 65	—	—	6, 6
—	—	»	29, 63	—	—	6, 8
—	—	»	35	—	—	7
—	—	»	39, 5	—	—	7, 2
—	—	»	42, 8	—	—	7, 4
—	—	»	45, 2	—	—	7, 6
—	—	»	46, 8	—	—	7, 8

Solution tampon de $B(OH)^a$	$\frac{N}{5}$	50 ^{cc} , ajouter KCl	$\frac{N}{5}$	50 ^{cc} , ajouter NaOH	$\frac{N}{5}$	3 ^{cc} 67	compléter à 200 ^{cc} avec eau bidistillée,	pH
—	—	—	—	»	8, 97	—	—	7, 8
—	—	—	—	»	5, 9	—	—	8
—	—	—	—	»	8, 5	—	—	8, 2
—	—	—	—	»	12,	—	—	8, 4
—	—	—	—	»	16, 5	—	—	8, 6
—	—	—	—	»	21, 3	—	—	8, 8
—	—	—	—	»	26, 7	—	—	9
—	—	—	—	»	32	—	—	9, 2
—	—	—	—	»	36, 85	—	—	9, 4
—	—	—	—	»	40, 8	—	—	9, 6
—	—	—	—	»	43, 9	—	—	9, 8
—	—	—	—	»	—	—	—	10

Les indicateurs colorés sont les suivants :

INDICATEURS	Virage	Limites de virage pH	Zone utile (utilisable avec les mi- lieux colorés en jaune) pH
Thymolphtaléine sulfonée (Bleu de Thymol.)	Rouge au jaune	1,2 — 2,8	
Tétrabromophénolphthaléine sul- fonée (Bleu de Bromophénol).	Jaune au bleu	3,0 — 4,6	4,0 — 4,6
Orthocarboxybenzène azodimé- thylaniline (Rouge de Methylene)	Rouge au jaune	4,4 — 6,0	4,4 — 6,0
Dibromoorthocrésolphthaléine sulfonée (Pourpre de Bromo- Crésol)	Jaune au violet	5,2 — 6,8	5,4 — 6,6
Dibromothymolphthaléine sulfo- née (Bleu de Bromothymol).	Jaune au bleu	6,0 — 7,6	6,0 — 7,6
Phénolphthaléine sulfonée (Rou- ge de Phénol).	Jaune au rouge	6,8 — 8,0	6,8 — 8,0
Orthocrésolphthaléine sulfonée (Rouge de Crésol).	Jaune au rouge	7,2 — 9,0	7,4 — 9,0
Thymolphthaléine sulfonée (Bleu de Thymol).	Jaune au bleu	8,0 — 9,6	8,6 — 9,6

Toutes les solutions obtenues avec ces colorants sont des solutions amenées à 500^{cc} avec de l'eau bidistillée et contenant 0 gr. 1 de produit dans :

5^{cc}7 de soude N, 20 pour le rouge de phénol

5^{cc}3 — pour le rouge de crésol

4^{cc}3 — pour le bleu de thymol

3^{cc}0 — pour le bleu de bromophénol

3^{cc}2 — pour le bleu de bromothymol

3^{cc}7 — pour le violet de bromocrésol

sauf pour la solution de rouge de methyle, dans laquelle la soude est remplacée par 300^{cc} d'alcool.

Les solutions colorantes sont conservées dans des flacons dont le bouchon émeri est constitué par un compte-gouttes à tétine. On évite ainsi l'évaporation de la solution et l'action du CO_2 atmosphérique.

Les échelles étalons sont obtenues par addition de X gouttes de solution colorante appropriée dans 10^{cc} de chaque solution étalon, placée dans des tubes à essais de mêmes dimensions et en verre neutre. On bouche avec des bouchons de liège paraffinés ou mieux on scelle les tubes à la lampe. Les proportions doivent toujours être respectées pour un même travail.

Pour plus de sécurité, les solutions étalons ont toutes été vérifiées au potentiomètre : elles indiquaient un pH très légèrement supérieur au pH théorique, mais cette différence étant constante pour chacune d'elles, on peut considérer les résultats comme satisfaisants.

Le comparateur employé est celui de BACH. Ce comparateur est un bloc de bois percé de trois séries de deux trous parallèles, chaque série est éclairée par une fenêtre latérale. Le bloc de bois est lui-même disposé au fond d'une boîte de bois noircie intérieurement, dont la profondeur correspond à la distance minima de la vision distincte. Le tout est monté sur un chevalet qui permet de maintenir l'appareil sous un angle de 30° par rapport à l'horizontale. Les rayons incidents sont tamisés par un verre dépoli ou suivant les cas par des verres rouges ou bleus.

Nos déterminations de pH sur les milieux de culture à étudier ont été faites toujours dans les mêmes conditions par rapport aux étalons colorés : tube à essais de dimensions analogues et proportions correspondantes de liquide à étudier et d'indicateur.

Les milieux sur lesquels nous opérons présentent quelques causes d'erreur au point de vue détermination stricte du pH (KOLTHOFF). Nous sommes en présence de substances tampons : le peptone en est une, dans nos milieux gélose-gélatine nous avons du phosphate bipotassique, etc... La présence de fortes doses de chlorure de sodium crée une cause d'erreur connue sous le nom d'erreur de sel, mais ici nous avons de faibles proportions de NaCl (5 p. 1.000), à peine une solution N/5. Nous savons aussi

que les protides réagissent très diversement et souvent très mal avec de nombreux indicateurs colorés. Pour éviter ce grave inconvénient, nous avons opéré avec des colorants du groupe des phtaléines, qui donnent de bons résultats en présence des produits de dégradation des matières protidiques.

Nous rappellerons pour mémoire que la concentration d'une solution ou d'un milieu de culture en ions H mesure son acidité réelle et actuelle, sa concentration en ions OH mesure son alcalinité réelle ou actuelle. Sa concentration en molécules inactives susceptibles de se dissocier en donnant des ions H ou OH mesure son alcalinité et son acidité potentielles. La totalité des ions H ou OH, qui s'y trouvent soit libres, soit combinés en molécules dissociables, déterminent son acidité et son alcalinité totales. La détermination de l'acidité actuelle constitue l'ionimétrie. La détermination de l'acidité et de l'alcalinité totales constitue la titrimétrie (méthodes volumétriques : acidimétrie et alcalinimétrie).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. — Limites de pH entre lesquelles se développe la bactériodie charbonneuse.

L'eau peptonée que nous avons utilisée est d'alcalinité très légère : 10^{cc} sont neutralisés par 6^{cc}3 d'acide chlorhydrique N 100 en présence de tournesol Gallois comme indicateur. Le pH = 7,2.

A cette eau peptonée, répartie par 10^{cc} dans treize tubes, on ajoute, comme l'indique le tableau ci-dessous, d'une part de l'acide chlorhydrique N/20 et d'autre part de la soude N/20 en quantités croissantes de manière à avoir une échelle parfaitement graduée de pH.

Pour l'ajustement de cette échelle on utilise le bloc comparateur à 6 trous, soit le schéma suivant :

Solution étalon
+ indicateur
 $\text{pH} < \text{pH}$ à obtenir

—

2

Eau distillée

—

4

Solution étalon
+ indicateur
 $\text{pH} > \text{pH}$ à obtenir

—

6

Milieu
sans indicateur

—

1

Milieu à ajuster
+ indicateur

—

3

Milieu
sans indicateur

—

5

Dans 2 et 6 on met donc deux tubes étalons de concentration ionique précédant et suivant celle à obtenir. Dans 1 et 5 des tubes du milieu sans indicateur. Dans 4 un tube d'eau distillée et dans 3 un tube du milieu à ajuster, plus la quantité d'indicateur proportionnelle et déterminée très nettement. Au tube 3 on ajoute alors goutte à goutte avec une burette graduée de la soude ou de l'acide chlorhydrique en solution N. 20, eux-mêmes teints du même indicateur et au même taux que la solution étalon ; continuer l'addition jusqu'à ce qu'on obtienne la teinte voulue, jugée par comparaison avec les tubes de l'échelle colorimétrique. En opérant ainsi par comparaison on arrive à déterminer la quantité d'acide ou d'alcali à ajouter au milieu de culture pour avoir un pH donné.

Nous avons utilisé l'échelle suivante :

	pH
Tube 1	6,2
— 2	6,4
— 3	6,6
— 4	6,8
— 5	7
— 6	7,2
— 7	7,4
— 8	7,6

Tube 9	7.8
— 10	8
— 11	8.2
— 12	8.4
— 13	8.6

On ensemence cette série de tubes avec une jeune souche charbonneuse sur gélose et parallèlement deux autres séries préparées de la même façon pour contrôle.

Après un séjour de 12 jours à l'étuve à 37° le développement microbien est suffisamment complet, la culture est tombée au fond du tube. *De visu* on juge assez facilement de l'importance de la culture microbienne. Ajoutons que les séries complémentaires ont confirmé les résultats de la première série et nos conclusions ont été partout uniformes. Nous résumerons les résultats obtenus dans le tableau suivant :

Tubes	pH correspondant	Développement microbien
—	—	—
1	6.2	Nul
2	6.4	Très faible
3	6.6	Faible
4	6.8	Faible
5	7	Assez abondant
6	7.2	Assez abondant
7	7.4	Abondant
8	7.6	Abondant
9	7.8	Abondant
10	8	Assez abondant
11	8.2	Faible
12	8.4	Très faible
13	8.6	Nul

Les spores apparaissent et suivent au point de vue nombre et importance la courbe du développement microbien. Dans le tube 5 on les observe en petit nombre, elles sont plus nombreuses au tube 7, dans les tubes 11 et 12 on constate une très faible culture et une sporulation très restreinte.

Ces expériences montrent que le pH 6,4 et 8,2-8,4 sont les limites extrêmes permettant le développement de la bactériodie charbonneuse.

II. — Variations de pH accompagnant le développement de la bactériodie charbonneuse.

En étudiant les limites de pH, entre lesquelles pouvait se développer la bactériodie charbonneuse, nous avons déterminé le pH avant et après le développement de la culture microbienne sur eau peptonée.

Connaissant déjà au départ le pH des tubes de culture, les mêmes que ceux que nous avons utilisés ci-dessus, une fois le développement microbien achevé après 12 jours d'étuve, nous avons déterminé le pH final toujours par la méthode colorimétrique et dans les conditions que nous avons déjà indiquées : après centrifugation et décantation de la partie claire.

Les résultats ont coïncidé dans nos trois séries d'expériences : nous avons observé chaque fois une très légère variation, la seule étant qu'il y avait eu développement bactériodien à peu près normal. Le tableau ci-dessous nous montre cette variation.

Tubes	Développement microbien	pH initial	pH final
1	Nul	6,2	
2	Très faible	6,4	6,4
3	Faible	6,6	6,6
4	Faible	6,8	6,8
5	Assez abondant	7	7,2
6	Assez abondant	7,2	7,4
7	Abondant	7,4	7,8
8	Abondant	7,6	7,8-8
9	Abondant	7,8	8
10	Assez abondant	8	8-8,2
11	Faible	8,2	8,2
12	Très faible	8,4	8,4
13	Nul	8,6	

En partant de pH normaux et toujours sur eau peptonée à 10 p. 1.000, deux autres essais sont venus confirmer l'ensemble de nos résultats.

1) Avant ensemencement une première eau peptonée avait un pH entre 7,4 et 7,6.

Après culture (12 jours d'étuve toujours) ce pH est passé à 7,8.

2) Sur une seconde eau peptonée notre pH qui était de 7,4 est passé à 7,6-7,8.

III. — Variations de l'acidité et de l'alcalinité totales dues au développement de la bactériodie charbonneuse.

Parallèlement à l'étude du pH et à ses variations sur les milieux de culture où se développe la bactériodie de DAVAINÉ, nous avons étudié les variations de l'acidité et de l'alcalinité totales par les méthodes volumétriques courantes. Nous avons vu que les ions OH augmentaient au fur et à mesure du développement microbien. La bactériodie accentue donc l'alcalinité du milieu sur lequel elle se développe. Bien que très faible, cette alcalinité a pu être suivie pendant l'évolution de la culture.

I. — 200^{cc} d'eau peptonée sont ensemencés avec du bacille charbonneux provenant comme d'ordinaire d'une jeune souche sur gélose. Cette eau peptonée est abandonnée douze jours à l'étuve à 37°. Tous les deux jours nous avons prélevé 10^{cc} de liquide de culture pour suivre les variations de réaction et en mesurer l'importance. On clarifie les prises d'essai par centrifugation. Nous nous servons du rouge de méthyle comme indicateur de virage.

10^{cc} de liquide initial avant ensemencement sont neutralisés par 1^{cc} 4 d'HCl N/10 lorsqu'on opère à froid et par 1^{cc} 5 lorsqu'on opère à chaud (présence légère de carbonate d'ammoniaque). Voici les résultats obtenus pendant le développement de la culture (on opère à chaud).

	HCl N/10 nécessaire pour neutraliser 10cc.
Liquide initial	1 ^{cc} 5
2 ^e jour	1 ^{cc} 8
4 ^e jour	2 ^{cc} 2
6 ^e jour	2 ^{cc} 6
8 ^e jour	2 ^{cc} 7
10 ^e jour	2 ^{cc} 7

Le douzième jour, on centrifuge la culture pour éliminer les éléments microbiens et les spores, on prélève 10^{cc} de la partie claire, il faut pour les neutraliser à froid 1^{cc}8 d'acide chlorhydrique N/10, à chaud il faut 2^{cc}7. Il y a donc eu production sensible de carbonate d'ammoniaque.

II. — 200^{cc} d'une deuxième eau sontensemencés et traités dans les mêmes conditions qu'en I. — Réaction nettement alcaline, avant ensemencement 10^{cc} sont neutralisés par 0^{cc}6 d'HCl N/10 à froid, par 0^{cc}65 en chauffant.

	HCl N/10 nécessaire pour neutraliser 10 cc.
Liquide initial	0 ^{cc} 6
2 ^e jour	1 ^{cc}
4 ^e jour	1 ^{cc} 4
6 ^e jour	1 ^{cc} 6
8 ^e jour	1 ^{cc} 6
10 ^e jour	1 ^{cc} 7

Le douzième jour après centrifugation 10^{cc} de milieu de culture sont neutralisés à froid par 1^{cc} d'acide chlorhydrique N/10 et à chaud par 1^{cc}7.

III. — On opère sur 200^{cc} d'une troisième eau peptonée. Avant ensemencement, 10^{cc} sont neutralisés à froid par 1^{cc}2, à chaud par 1^{cc}3 d'HCl N/10. Pendant le séjour à l'étuve on note les variations d'alcalinité suivantes :

	HCl N/10 nécessaire pour neutraliser 10 cc.
Liquide initial	1 ^{cc} 3
2 ^e jour	1 ^{cc} 5
4 ^e jour	2 ^{cc} 2
6 ^e jour	2 5
8 ^e jour	2 6
10 ^e jour	2 6

Au bout de douze jours d'étuve, 10^{cc} d'eau peptonée débarrassés des éléments microbiens sont neutralisés par 2^{cc} d'HCl N 10 en opérant à froid et 2^{cc}6 en opérant à chaud.

Des résultats tout à fait analogues ont été obtenus dans plusieurs autres expériences. Le développement de la bactériodie de DAVAINÉ en eau peptonée s'accompagne donc d'un accroissement d'alcalinité, accroissement relativement faible il est vrai et loin d'être comparable avec la fermentation provoquée dans les mêmes conditions par la plupart des bactéries. Cette alcalinité est due en majeure partie à la formation d'ammoniaque, comme permet de le constater la distillation du milieu de culture, débarrassé par filtration sur bougie de tout élément bactéridien. Cependant, une partie seulement de l'ammoniaque produit est libre, l'autre (70 % en moyenne) étant à l'état de carbonate et c'est justement pour chasser l'acide carbonique que l'on soumet le milieu à l'ébullition pendant le titrage volumétrique en présence de rouge de méthyle.

IV — Etude du pH, de l'acidité et de l'alcalinité totales sur des milieux synthétiques.

Les recherches que nous venons d'effectuer apportent quelques renseignements nouveaux sur les modifications chimiques apportées aux milieux de culture et en particulier à l'eau peptonée par suite du développement de la bactériodie charbonneuse. Cependant il s'agit là d'indications générales plutôt que de données très précises en raison de la complexité des milieux employés.

L'emploi presque exclusif des peptones n'écarte pas cette objection, car les peptones commerciales sont nettement différentes les unes des autres suivant leur mode de préparation : peptones pepsiques, c'est-à-dire obtenues avec la pepsine en milieu acide, peptones trypsiques, résultant de l'action de la trypsine en milieu alcalin. En outre leur degré de pureté est loin d'être satisfaisant et tandis que quelques-unes contiennent encore des albumines imparfaitement décomposées (acides ou alcali-albumines, albumoses, etc.), d'autres renferment des proportions parfois importantes d'acides aminés par suite d'une attaque plus profonde de la molécule protidique. Il est bien difficile dans ces conditions (même en opérant avec une seule marque de peptone comme nous l'avons fait) d'obtenir des résultats tout à fait comparables, et des méthodes aussi délicates que l'ionimétrie ne trouvent pas une application bien rigoureuse. D'autre part, plus un milieu est simple et constitué d'éléments de composition chimique constante et facile à analyser, plus l'étude d'une fermentation produite au sein de ce milieu par un microbe déterminé est précise et aisée à effectuer.

C'est pour éviter ces écueils et ces difficultés que M. le Professeur RADAIS, doyen de la Faculté de Pharmacie, nous a conseillé l'emploi, dans toute la mesure du possible, de milieux synthétiques constitués par des corps aussi simples et de formule chimique aussi bien définie que possible. Malheureusement, comme nous le verrons plus loin, nous avons épuisé la liste des milieux synthétiques connus sans résultat appréciable. Sur les indications de M. PIETTRE nous avons préparé une longue série de milieux nouveaux, parmi ceux-ci seul le mélange gélose-gélatine nous a paru satisfaisant à un point de vue d'ailleurs autre que celui que nous recherchions. C'est que le bacille charbonneux, bien que très « rustique », conservant tenacement et sa virulence et sa fixité, est très délicat à cultiver. Tandis que la plupart des bactéries, même des bactéries pathogènes, telles que le bacille diphtérique, le bacille de KOCH, les paratyphiques etc., s'accommodent des conditions les plus diverses, le bacille du charbon ne se multiplie que dans des milieux très particuliers et dans des conditions d'alca-

linité assez étroites, comme les expériences précédentes viennent de le démontrer.

Nous avons donc entrepris la préparation longue et laborieuse d'une série de milieux, que nous appellerons synthétiques à cause des éléments simples entrant dans leur composition. Ces milieux une fois préparés ont toujours été ensemencés avec une souche jeune de charbon sur gélose bien vigoureuse et bien sporulée. Toutes les cultures ont été entretenues à l'étuve à 37°.

Milieux synthétiques classiques :

Milieu de Sauton.

Eau	1.000
Glycérine	60
Acide citrique	2
Phosphate bipotassique.	0,5
Sulfate de magnésie	0,5
Citrate de fer ammoniacal.	0,005
Asparagine	4

Développement microbien nul.

Milieu de Sauton modifié. — On substitue à l'asparagine soit du glycocole soit de la leucine, chacun de ces acides aminés étant employé aux mêmes doses que l'asparagine, les autres éléments du milieu restant dans la même proportion.

Dans les deux cas les résultats ont été également négatifs.

Les milieux de Raulin et de Pasteur. essayés par acquit de conscience, n'ont pas permis davantage le développement de la bactériodie.

Différents milieux liquides constitués avec des proportions variables d'acides aminés seuls ou associés : glycocole, leucine, alanine, glucosamine, acide aspartique, tyrosine avec les mêmes bases minérales (chlorure de sodium, phosphate bipotassique) se sont montrés également impropres au développement du

Charbon. L'addition de divers sucres, glucose, lévulose, galactose, maltose, saccharose, a été sans résultat appréciable.

Devant ces résultats négatifs, nous sommes revenu à des substances un peu plus complexes et d'abord à la gélose. Seule, cette gélose dissoute dans l'eau dans la proportion de 20 grammes pour 1.000 s'est montrée insuffisante pour donner lieu à un développement bactérien quelconque, d'ailleurs dans un milieu de culture nous la considérons surtout comme un substratum et bien peu comme un aliment. Nous avons donc ajouté à des solutions de gélose des substances organiques et des éléments minéraux très nutritifs aussi simples et aussi bien définis que possible.

La consistance solide des milieux qui vont suivre surprendra peut-être tout d'abord, mais si nous avons réalisé ces essais avec une proportion assez élevée de gélose, c'est que nous voulions placer nos cultures dans les conditions optima de développement (l'aération étant une de ces conditions). En cas de résultats positifs nous avons l'intention par la suite avec des doses de moins en moins élevées de gélose d'arriver, tout au moins aux températures de l'étuve, à des milieux de consistance suffisamment liquide pour nous permettre de faire des déterminations de pH par la méthode colorimétrique.

Milieu gélose-phosphate de potasse :

Gélose	20
Phosphate bipotassique.	10
Chlorure de sodium	5
Eau distillée.	1.000

a) Avec ce milieu très légèrement alcalin au tournesol Gallois : développement microbien nul.

b) Avec ce milieu très légèrement acide : développement microbien nul.

c) A la neutralité : développement microbien nul également.

Milieu gélose-créatine :

Gélose	20
Phosphate bipotassique.	10
Chlorure de sodium	5
Créatine	2
Eau distillée.	1.000

Réaction très légèrement alcaline. Développement microbien nul.

Milieu gélose-glycocolle :

Gélose	20
Phosphate bipotassique.	10
Chlorure de sodium	5
Glycocolle.	2
Eau distillée.	1.000

Réaction très légèrement alcaline. Développement microbien nul.

Milieu gélose-glycérophosphate de chaux :

Gélose	20
Glycérophosphate de chaux	10
Chlorure de sodium	5
Eau distillée.	1.000

- a) Avec une alcalinité très légère } développement très faible,
 b) Avec une acidité très légère } nettement insuffisant.

Milieu gélose-glycérophosphate-créatine :

Gélose	20
Glycérophosphate de chaux	10
Chlorure de sodium	5
Créatine	0,20
Eau distillée.	1.000

Développement microbien insignifiant.

Milieu gélose-glycérophosphate-glycocolle :

Gélose	20
Glycérophosphate de chaux	10
Chlorure de sodium	5
Glycocolle.	0,20
Eau distillée.	1.000

Développement microbien à peu près nul.

Milieu gélose-glycérophosphate d'ammoniaque :

Gélose	20
Glycérophosphate d'ammoniaque	10
Chlorure de sodium	5
Eau distillée.	1.000

Réaction légèrement alcaline. Développement microbien nul.

Milieu gélose-glycérophosphate d'ammoniaque-créatine :

Gélose	20
Glycérophosphate d'ammoniaque	10
Chlorure de sodium	5
Créatine	0,20
Eau distillée.	1.000

Réaction légèrement alcaline. Développement microbien nul.

Milieu glycérophosphate d'ammoniaque-glycocolle :

Gélose	20
Glycérophosphate d'ammoniaque	10
Chlorure de sodium.	5
Glycocolle.	0,20
Eau distillée.	1.000

Réaction légèrement alcaline. Développement microbien toujours nul.

Devant de tels essais pratiquement négatifs, nous avons eu recours aux substances organiques complexes habituellement employées. Nous nous écartons, il est vrai, du but que nous nous étions proposé au début de ces expériences, mais cette étude graduée au point de vue de la complexité des milieux nous montrera au moins les exigences nutritives de la bactérie charbonneuse. Suivant les indications de M. Piettre, nous avons essayé la gélatine la plus pure possible en y ajoutant les sels minéraux indispensables au développement de la plupart des micro-organismes. Les premiers essais ont été réalisés avec des solutions de gélatine à 10 p. 100, contenant du phosphate bipotassique (10 p. 1000) et du chlorure de sodium (5 p. 1.000). Mais ces solutions de gélatine nous ont donné à leur tour un mauvais rendement, le développement microbien était faible pour ne pas dire insignifiant. L'addition de gélose à ces substances nous a conduit à des résultats meilleurs et nous avons finalement mis au point un milieu ayant la composition suivante :

Par abréviation nous l'appellerons : « *Milieu P. V.* ».

« *Milieu P. V.* » (solide) :

Gélatine	50
Gélose	18
Phosphate bipotassique	10
Chlorure de sodium	5
Eau distillée	1.000

La culture est presque aussi abondante que sur gélose ordinaire. Ce milieu étant solide aux températures normales de l'étuve, nous avons essayé de réduire les doses de gélose afin d'obtenir un milieu liquide vers 30-35°. Après d'assez longs tâtonnements nous avons adopté la formule suivante, qui nous a donné une culture charbonneuse aussi belle que sur eau peptonée, bouillon nutritif, etc...

« Milieu P. V. » (liquide) :

Gélatine	50
Gélose	2
Phosphate bipotassique	10
Chlorure de sodium	5
Eau distillée	1.000

On fait dissoudre dans l'eau à douce ébullition d'abord les deux sels et ensuite la gélatine et la gélose finement coupées. Après dissolution on obtient un liquide visqueux, de réaction nettement alcaline au tournesol Gallois. Avec l'acide chlorhydrique titré on ramène à une alcalinité voisine de 1^{cc} 5-2^{cc} de soude normale pour 100^{cc} de milieu. Le pH se localise aux environs de 7,4. Le milieu ainsi neutralisé est passé sur filtre Chardin ébouillanté et réparti en tubes comme du bouillon ordinaire.

Ce milieu est légèrement jaune et opalescent. Le développement microbien a lieu en surface sous forme de voile très dense. La viscosité du milieu empêche la culture de tomber au fond du tube. Cette viscosité d'autre part nous gênera grandement pour les déterminations du pH, la matière colorante se diffusant mal. Les résultats obtenus sont cependant suffisamment nets pour nous donner une idée approchée des variations de la concentration en ions Hydrogène.

Nous avons opéré sur 3 fioles d'Erlenmeyer de 500^{cc} contenant chacune 200^{cc} de gélose-gélatine liquide. Après ensemencement avec une souche jeune de Charbon sur gélose peptonée, nous les avons laissées séjourner douze jours à l'étuve.

Voici les résultats de trois séries d'expériences :

1) Avant ensemencement 10^{cc} du milieu sont neutralisés par 2^{cc} 2 d'acide chlorhydrique N/10 au tournesol Gallois, par 4^{cc} 1 avec le rouge de méthyle à froid et par 5^{cc} 2 à chaud.

Le pH = 7,4

Après ensemencement et séjour à l'étuve il nous faut 2^{cc} 9 d'HCl N/10, au tournesol Gallois, 5^{cc} 2 au rouge de méthyle à froid et 6^{cc} 5 à chaud.

pH = 7,8

2) *Avant* ensemencement 10^{cc} sont neutralisés par 1^{cc}8 d'acide chlorhydrique N/10 au tournesol Gallois, par 3^{cc}8 au rouge de méthyle à froid et 4^{cc}5 à chaud.

$$\text{pH} = 7,2-7,4$$

Après ensemencement et séjour à l'étuve, 10^{cc} sont neutralisés par 2^{cc}2 d'HCl N/10 au tournesol, par 5^{cc} au rouge de méthyle à froid et 5^{cc}1 à chaud.

$$\text{pH} = 7,6$$

3) *Avant* ensemencement 10^{cc} sont neutralisés par 2^{cc} d'acide chlorhydrique N/10 au tournesol Gallois, par 4^{cc}4 au rouge de méthyle à froid et 4^{cc}6 à chaud.

$$\text{pH} = 7,4$$

Après culture il faut 2^{cc}5 d'HCl N/10 au tournesol, 5^{cc}7 au rouge de méthyle à froid et 6^{cc}9 à chaud.

$$\text{pH} = 7,6$$

Ces résultats sont sensiblement de même ordre que ceux obtenus sur eau peptonée. La végétation microbienne s'est accompagnée d'un léger accroissement de l'alcalinité, tout au plus peut-on signaler une proportion moindre de carbonate d'ammoniaque.

En étudiant ces milieux à base de gélose-gélatine, notre attention a été attirée par une question toute spéciale : la modification de la morphologie et même de la virulence de la bactériodie charbonneuse. Ces variations nous ont paru si importantes que nous avons condensé leur étude dans une partie toute spéciale de notre travail.

CINQUIÈME PARTIE

LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE FORMES ASPOROGÈNES ATTÉNUATION DE LA VIRULENCE (1)

A. — BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE ASPOROGÈNE

L'obtention de bactéridie charbonneuse asporogène est un des problèmes les plus importants en microbiologie, car seule la bactéridie non sporulée peut être soumise aux procédés classiques d'atténuation et servir, par suite, à l'obtention de vaccins exactement titrés. La spore, qu'il est très difficile d'atténuer, conserve la virulence de l'espèce et expose aux accidents encore si fréquents dans la vaccinothérapie charbonneuse. C'est dire toute l'importance que les bactériologistes ont en tout temps attribuée à la forme asporogène du charbon.

Nous résumerons rapidement les principales techniques utilisées jusqu'à ce jour pour l'obtention de cultures non sporulées de bacille charbonneux.

PASTEUR, le premier, a vu que dans les vieilles cultures en gélatine la bactéridie perd parfois la propriété de donner des spores. De même il a constaté que dans du bouillon ensemencé de sang charbonneux et mis à l'étuve à 42°5 la bactéridie se développe, mais elle ne sporule pas. Dans l'intérieur des bâtonnets on peut voir des granulations brillantes, mais ce sont les « fausses spores » de Chauveau, qui n'ont aucune des propriétés de la spore

(1) C. R. Académie des Sciences, séance du 10 novembre 1930, t. 191, p. 886.

véritable. La bactériodie ainsi asporulée, réensemencée dans un milieu nutritif normal, portée à la température optimum, ne tarde pas à donner à nouveau des spores. Ces premières remarques faites par Pasteur ont servi de base à la solution du difficile problème de la vaccination anticharbonneuse, aujourd'hui encore pour la préparation du vaccin à l'Institut Pasteur de Garches on se sert de cultures développées à la température de 42°5.

Procédé Roux à l'acide phénique : — On répartit dans de nombreux tubes (30 à 50) du bouillon de veau peptonisé, légèrement alcalin, à raison de 10^{cc} par tube. On divise ces tubes en plusieurs séries de 10 chacune. Dans chaque série les tubes sont numérotés : 1, 2, 3..., 9, 10. A chaque tube on ajoute une solution phéniquée dans l'eau à 1 pour 100, dans une proportion telle que :

le tube 1	contienne	2/10.000	d'acide phénique	soit	0 ^{cc} 2
— 2	—	4/10.000	—	—	0 ^{cc} 4
— 3	—	6/10.000	—	—	0 ^{cc} 6
— ...	—		—	—	
— 10	—	20/10.000	—	—	2 ^{cc}

Les tubes sont bouchés au coton, leur extrémité est scellée à la lampe pour empêcher l'évaporation de l'acide phénique, puis ils sont stérilisés à l'autoclave. Après refroidissement, chaque tube est ouvert et ensemencé avec une goutte de sang charbonneux. Après l'ensemencement les tubes sont capuchonnés et mis à l'étuve à 37°. Vers le 10^e jour on examine les cultures, un certain nombre de tubes n'ont donné aucun développement, ce sont ceux où se trouvent les plus fortes doses d'acide phénique (tubes 7 à 10). Les premiers tubes de 1 à 3 contiennent des bactériodies et des spores, enfin les tubes 4, 5, 6 pourront renfermer des bactériodies à l'exclusion de spores. Mais on n'obtient pas toujours, surtout une première fois, des résultats satisfaisants, c'est pourquoi on conseille d'opérer simultanément sur plusieurs séries de tubes.

Le meilleur contrôle pour constater la présence ou l'absence des spores est, non pas la coloration et l'examen microscopique,

mais le chauffage de la culture à 90° pendant 5 minutes. Tout ce qui n'est pas spore est détruit, les spores seules résistent et peuvent redonner sur des milieux convenables des bâtonnets normaux. Bien qu'un des meilleurs pratiquement, ce procédé est quelquefois incertain. SURMONT et ARNOULD ont montré en effet que la faculté de devenir asporogène varie beaucoup par exemple pour les bactériidies de diverses provenances : telle bactériдие venant de l'Institut Pasteur devenait facilement asporogène entre les mains de certains expérimentateurs, tandis que telle autre provenant d'une pustule charbonneuse de l'homme se comportait tout différemment pour d'autres bactériologistes.

Procédé CHAMBERLAND et ROUX au bichromate de potasse : — ce procédé, antérieur au précédent, donne encore des résultats inconstants : le bichromate est employé d'après les mêmes règles que l'acide phénique, mais en proportions différentes, la solution dans du bouillon à 1 pour 200 est celle qui convient le mieux.

Nous ne citerons que pour mémoire les procédés de BEHRING à l'acide rosolique et à l'acide chlorhydrique, celui de PHYSALIX basé sur l'emploi de la chaleur (cultures successives à 42°5). Plus récemment PHYSALIX et BORMANS ont conseillé les cultures en sérum de chien ou de cheval, PHYSALIX les cultures en sacs de collodion dans le péritoine du chien.

Ces procédés divers donnent à peu près tous des résultats incertains. Nous devons en dire de même du procédé indiqué par ABT et basé sur l'emploi de cultures successives de bactériдие de DAVAINЕ sur pommes de terre glycélinées.

Procédé ABT, pommes de terre glycélinées : — Pour préparer ces tubes de pommes de terre glycélinées, on opère de la façon suivante : des demi-cylindres de pomme de terre sont mis à macérer pendant quatre heures dans de l'eau glycélinée à 4 pour 100. Du bouillon nutritif additionné de 4 pour 100 de glycérine est réparti dans chaque tube de pomme de terre jusqu'aux deux tiers de l'extrémité inférieure au-dessous de l'étranglement, ils sont introduits dans des tubes, qui, bouchés au coton, sont

stérilisés à 115°. Après la stérilisation les tubes sont inclinés et le lendemain capuchonnés.

On fait des passages successifs et quotidiens de bactériodie charbonneuse dans des tubes ainsi préparés. Au 10^e tube on voit la proportion des spores nettement diminuer et au 12^e-15^e passage disparaître pratiquement, mais sans cependant apporter une certitude absolue. On a essayé de remplacer les pommes de terre glycélinées par du bouillon glycéliné, de la gélose glycélinée, mais la disparition de la propriété sporogène s'établit toujours plus lentement ou plus difficilement.

DUCLOUX en 1920 a donné une technique d'obtention de bactériodie charbonneuse asporogène en utilisant comme milieu de culture des tissus végétaux contenant en abondance des hydrates de carbone et plus particulièrement des mucilages. Il prenait le suc cellulaire de l'*Opuntia vulgaris* en solution diluée, contenant selon l'époque de la végétation et en proportion variable des mucilages : amidon, sucres, sels de chaux et de potasse.

Après stérilisation on ensemence le milieu, on repique sur le même milieu par simple passage toutes les 24 heures environ. A partir du 38^e passage, la faculté de sporuler se perd complètement. Les cultures de passages successifs ne sont plus vivantes au 30^e jour. Après ensemencement en bouillon de bœuf peptoné, la sporulation ne se révélait pas au 40^e passage, quatre séries successives de cobayes n'ont pas fait reparaitre non plus la sporulation. Les produits retirés de la partie externe de la graine du *Linum usitatissimum*, utilisés comme milieu de culture, amènent aux mêmes résultats au point de vue sporulation. En ce qui concerne la virulence, elle est nettement diminuée à partir du 40^e passage.

Outre ces diverses méthodes d'obtention de bactériodie charbonneuse asporogène sur des milieux spéciaux, il faut signaler les travaux de PREISZ, qui a minutieusement étudié le développement de ce bacille sur gélose. Sur la culture la plus habituelle, la plus normale, celle qui est capable de former des spores en abondance, on constate la présence de deux types

de colonies sporogènes : A, donnant des colonies filamenteuses plates, B, avec des colonies plus bombées, plus blanches et formées essentiellement de bâtonnets trapus, isolés. Ces deux types A et B sont tous deux capables à leur tour de donner lieu à des colonies secondaires, appelées « rosettes hyalines », et à des colonies tertiaires, appelées « colonies bouton », tout cela sur le même milieu de culture et au bout d'un certain temps. PREISZ ne s'est pas borné à l'étude d'une souche unique, il en a observé un grand nombre et a trouvé que certaines colonies ne manifestaient qu'une aptitude sporogène exceptionnellement faible, ou même à peu près nulle.

EISENBERG continuant les recherches de PREISZ recueillit cette importante donnée que la plupart des cultures de Charbon qu'on entretient au laboratoire contiennent deux types de germes ; les uns sporogènes, les autres asporogènes et qu'il suffit pour se les procurer à l'état pur de recourir à la méthode habituelle d'isolement sur gélose. Mais entre les deux types extrêmes et parfaitement caractérisés, on peut trouver des types intermédiaires. Tout récemment BORDET et RENAUX, de l'Institut Pasteur de Bruxelles, en cultivant sur de la gélose oxalatée d'un côté, et de la gélose calcifiée de l'autre, les colonies A décrites par PREISZ, ont obtenu deux races de bacille charbonneux : 1^o sur la gélose décalcifiée un bacille sporogène ; — 2^o sur la gélose additionnée de chlorure de calcium une race pratiquement asporogène, le calcium ayant une influence nettement défavorable sur la sporulation.

Les recherches d'ABT, DUCLOUX, PREISZ, BORDET, montrent déjà l'influence d'un milieu de culture, non soumis à l'action de la chaleur, ni additionné d'antiseptique, sur l'évolution de la bactérie charbonneuse et principalement sur la formation des spores. Mais tous ces procédés, comme ceux de ROUX, CHAMBERLAND, sont d'une réalisation longue et souvent difficile, leurs conclusions d'autre part ne sont pas rigoureuses tant au point de vue de la présence des spores que de la vitalité des formes bactériennes obtenues.

Nous avons vu au chapitre précédent que les résultats peu

satisfaisants obtenus avec les milieux synthétiques nous ont contraint à nous rapprocher des milieux habituellement employés en microbiologie. Nous avons notamment essayé des *milieux pauvres*, dits « *de carence* », imaginés par M. PIETTRE pour la culture des algues. Le « *milieu P. V.* » à base de gélose-gélatine nous a paru d'autant plus intéressant que nous avons remarqué en l'utilisant une influence nettement défavorable en ce qui concerne la sporulation du charbon.

Le milieu gélose-gélatine convenablement minéralisé, dont nous indiquons plus loin la composition exacte et le mode de préparation, nous a donné dès le début des résultats très intéressants. Sur ce milieu nous avons constaté que la bactériodie après quelque retard au début se développait très bien, avec autant de vigueur même que sur les milieux de choix (eau peptonée, gélose peptonée), mais avec une tendance manifeste vers la production d'un mycélium très peu sporulé. C'était là une indication précieuse sur la possibilité d'entraver toute formation de spore et par suite d'arriver à une forme asporogène permettant l'atténuation progressive de la virulence. Tous les efforts des bactériologistes en vue de préparer des vaccins ont toujours porté, comme nous l'avons vu, sur l'obtention de bactériodies asporogènes à l'aide d'antiseptiques, de la chaleur et même de l'oxygène sous pression. Mais ces moyens atteignent en même temps fortement la *vitalité de la bactériodie* et il serait certainement *préférable d'obtenir le même résultat par des moyens plus doux tels qu'un simple changement de milieu nutritif*. Ce résultat, le milieu gélose-gélatine semble pouvoir nous le procurer. Sous cet angle les recherches entreprises entrent dans le cadre de notre sujet, consacré à l'étude des conditions de développement et de culture de la bactériodie charbonneuse.

MILIEU GÉLOSE-GÉLATINE, OU MILIEU P. V.

I. — *Composition.* — Après de nombreux tâtonnements nous avons donné au milieu de carence que nous a proposé M. PIETTRE la formule suivante :

Gélatine	50
Gélose (1)	18
Phosphate bipotassique	10
Chlorure de sodium	5
Eau distillée	1.000

II. — *Préparation.* — On fait d'abord dissoudre à chaud dans l'eau les deux sels minéraux, on porte à une douce ébullition la solution obtenue et on y dissout en agitant la gélatine, puis la gélose finement coupées. On prend la réaction du milieu qui est nettement alcaline au tournesol. Avec des substances aussi pures que possible, surtout en ce qui concerne le phosphate bipotassique, qui nous a été fourni par la maison Rhône-Poulenc, l'alcalinité exprimée en soude normale est voisine de 2^{cc}-2^{cc}5 pour 100^{cc} de milieu avec le tournesol Gallois comme indicateur. Avec le rouge de méthyle nous trouvons des chiffres voisins de 3^{cc} à froid et 4^{cc} à chaud. Pour ces dosages volumétriques nous avons dilué une partie de notre milieu solide dans deux parties d'eau distillée. Nous avons préparé des milieux avec des alcalinités plus faibles (1^{cc}5-0^{cc}5), mais le développement des cultures a paru plutôt inférieur, en tout cas pas plus abondant, la première alcalinité a donc été conservée comme étant la plus favorable. Le milieu obtenu après solubilisation de la gélose et de la gélatine est filtré directement sur du papier Chardin ébouillanté et réparti dans des tubes sur deux largeurs de doigt. On stérilise à l'autoclave à 110-112° pendant 20 minutes. Avant refroidissement les tubes sont inclinés comme pour la gélose ordinaire. On obtient un milieu très faiblement coloré en jaune, transparent, légèrement fluorescent, gardant sa consistance solide à 35-37°, température de l'étuve. Par abréviation nous appellerons ce milieu « milieu P. V. ».

III. — *Ensemencements, cultures, examen de ces cultures.* — Sur ce milieu nous avons fait des repiquages successifs d'un

(1) Cette gélose contenait pour 100 : Calcium 1,055 ; Phosphore, 0,0099.

bacille charbonneux vigoureux, provenant de deux passages consécutifs sur gélose peptonée, passages d'une durée de quatre heures chacun environ, afin d'ensemencer le minimum de spores. L'examen, entre lame et lamelle, d'un prélèvement du deuxième passage montrait une spore environ pour 200 à 300 bâtonnets.

Pour les trois premiers passages, nous avons laissé entre chacun d'eux quatre jours d'intervalle. Au début, en effet, la bactériodie s'acclimate difficilement, elle met 48 heures avant de partir pour le premier passage, 24 heures environ pour le second. Au troisième passage elle part dès le premier jour. Pour les passages suivants, n'ayant plus de perte de temps au départ, trois jours suffisent entre chaque repiquage. Les tubes ensemencés sont mis à l'étuve à 35-37° comme de coutume.

Chaque jour au microscope nous avons examiné les cultures et noté soigneusement les variations morphologiques des bâtonnets, l'intensité des diverses colorations et surtout la proportion plus ou moins grande des spores.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

25 *Juin* : Ensemencement de bacilles charbonneux jeunes (4 heures) sur « milieu P. V. ».

Le 26, pas de développement ; le 27, deux ou trois petites colonies tout au plus apparaissent, elles forment de petits points arrondis de la grosseur de deux têtes d'épingles réunies. Ces colonies sont crénelées, blanchâtres, avec une nuance légèrement jaune. Le 28, elles sont de plus en plus abondantes, la surface d'ensemencement commence à se couvrir d'un enduit crémeux, légèrement gris, jaunâtre, enduit qui sera continu le lendemain 29.

A l'*examen microscopique* : bâtonnets assez courts, la plupart sont repliés sur eux-mêmes, les filaments sont de longueur plutôt réduite, et formés seulement de quelques éléments. Ces bacilles, qui rappellent des formes d'involution, se colorent difficilement par les colorants habituels : bleu de méthylène,

safranine, gram. Fait très important à signaler, par rapport à une culture de même âge sur gélose peptonée, on voit une différence énorme dans la proportion des spores : alors que dans le premier cas elles sont dans la proportion approximative de 1.000 spores pour 50 à 100 bacilles, ici nous trouvons 200 à 300 spores pour 1.000 bacilles.

29 Juin : 1^{er} repiquage.

La culture part seulement le lendemain 30. On aperçoit de nombreuses colonies arrondies à bords crénelés. Le 1^{er} juillet la surface est déjà recouverte d'un bel enduit ayant le même aspect que celui du premier ensemencement.

L'*examen microscopique* avant et après coloration montre les mêmes caractéristiques que ci-dessus : bâtonnets courts, encore nettement repliés, contournés, mais le nombre des spores a sensiblement diminué = 20 à 25 spores pour 75 à 80 bacilles.

3 Juillet : 2^e repiquage.

La culture part cette fois dans les premières 24 heures. Au bout de trois jours l'enduit crémeux habituel est formé, il est presque comparable à celui qu'on peut voir sur une gélose peptonée d'âge égal. Le développement de la culture paraissant maintenant normal, nous ne conserverons plus que trois jours entre chaque passage.

Au *microscope* : les filaments bactériidiens deviennent plus longs, les bâtonnets s'allongent légèrement et sont moins déformés que précédemment. A partir de ce deuxième repiquage la bactéridie semble s'être définitivement adaptée au milieu. Les divers colorants eux aussi se fixent avec plus d'intensité. Les spores continuent toujours à diminuer sensiblement, on en compte une moyenne de 5 à 10 pour 90 à 95 bâtonnets. On constate que les filaments sont très longs et à articles relativement courts : c'est donc une *prédominance de la forme mycélienne, qui coïncide avec le ralentissement très net de la sporulation.*

6 Juillet : 3^e repiquage :

La culture se développe normalement, au troisième jour on a, à la surface du milieu, une couche crémeuse très abondante. A l'*examen microscopique* les caractères précédents s'accroissent :

filaments mycéliens très longs, plusieurs s'entremêlant les uns les autres, articles toujours courts, à gaines particulièrement nettes, spores de plus en plus rares : 5 pour 100 éléments microbiens environ.

9 Juillet : 4^e repiquage.

Le développement est très abondant, une culture luxuriante envahit toute la surface nutritive. Les spores se trouvent raréfiées, mais il en existe encore 2, 3, 4 pour une proportion de 100 filaments mycéliens environ.

On tente un *sixième passage* le 12 juillet, un *septième* le 15, mais sans obtenir une diminution plus accentuée des spores. Les essais poussés jusqu'au *douzième repiquage* n'ont pas changé le rapport spores-bacilles. En fin de compte nous ne sommes pas arrivé à arrêter totalement la sporulation et s'il est vrai de dire qu'on obtient *pratiquement une bactéridie asporogène*, *au point de vue théorique la chose n'est pas rigoureusement exacte*. Ces résultats sont néanmoins très intéressants et leur intérêt réside dans ce fait qu'ils sont obtenus par un simple changement de la nutrition avec une rapidité et une facilité qui laissent loin les expériences de nos prédécesseurs.

Ajoutons que ces repiquages successifs ont été renouvelés dans d'autres séries d'expériences en septembre et octobre pour l'étude de la virulence des formes obtenues et que les résultats ont confirmé point par point l'influence nettement antispiculante de notre milieu.

Sachant que le pouvoir de sporuler de la bactéridie charbonneuse est nettement moins intense en milieu liquide, nous avons songé à utiliser le *milieu gélose-gélatine liquide*, décrit au chapitre précédent pour étudier les variations de pH. Après plusieurs repiquages, même après ensemencement d'un quatrième, cinquième et sixième passage sur milieu P. V. solide, nous ne sommes pas arrivé à éliminer complètement les spores. La culture d'ailleurs se développe uniquement à la partie supérieure du milieu liquide, cherchant à accaparer le plus possible d'oxygène. Nous avons déposé notre semence au fond du tube ou

encore au centre du milieu pour annihiler autant que possible cette influence de l'air, mais nous n'avons pu obtenir aucun développement microbien en profondeur.

Nous basant sur l'opinion de ROSENTHAL, affirmant que le bacille du Charbon peut être transformé en anaérobie facultatif en le cultivant dans des milieux de moins en moins riches en oxygène et que devenu anaérobie il ne donne plus de spores, nous avons tenté de raréfier l'air dans des tubes contenant ce même milieu gélose-gélatine liquide. Dans une première série d'expériences 10 tubes, préalablementensemencés avec un 5^e passage sur milieu solide, sont étirés dans leur partie médiane et soumis à un *vide* incomplet permettant d'enlever seulement l'air ambiant sans toucher à l'air dissous ou en suspension. Il est facile de faire cette discrimination, car le départ des gaz contenus dans le milieu nutritif est signalé par l'apparition de bulles qui se dégagent difficilement en raison de la viscosité de la gélose et de la gélatine. Aussitôt ce *vide* relatif achevé, chaque tube est mis à l'étuve, après avoir été scellé à la lampe à sa partie étirée pour éviter la rentrée de l'air. On constate que le développement est faible, localisé seulement sur une hauteur de 1 centimètre à la surface du liquide. En profondeur il ne se produit aucune culture, même si la semence a été déposée, comme nous l'avons indiqué plus haut, au fond de chaque tube. Les peu nombreux filaments charbonneux ne se développent qu'à la surface et là seulement, grâce sans doute aux traces d'oxygène restant. A l'examen microscopique nous retrouvons encore quelques rares spores. Dans une deuxième série d'expériences, le *vide* a été poussé un peu plus loin, jusqu'au dégagement de nombreuses bulles gazeuses, nous n'avons cette fois obtenu aucune culture, même après quinze jours d'étuve.

B. — BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE ASPOROGÈNE : ATTÉNUATION DE LA VIRULENCE

On sait, par les expériences antérieures de nombreux bactériologistes, que l'atténuation de la virulence accompagne toujours

plus ou moins la disparition des spores. Ce résultat peut il est vrai s'expliquer par le fait que cette disparition est due à une action énergétique des moyens employés : vieillissement des cultures, chaleur (Pasteur, Chauveau), acide phénique, bichromate de potasse (Chamberland, Roux), moyens qui modifient profondément et sans nul doute la vitalité de la bactériodie. L'obtention de formes asporogènes par ABT, DUCLOUX, tout en étant plus douce, n'en impose pas moins une acidité anormale (17^{e} HCl N/10 pour 100^{e} de liquide des tubes de pomme de terre). Leurs procédés, d'autre part, sont d'une réalisation longue et souvent difficile. Ils n'apportent pas non plus, comme nous l'avons déjà dit, de garanties absolues au point de vue de la présence des spores, ils ne donnent pas de précisions suffisantes sur la virulence et la vitalité des formes mycéliennes obtenues.

Dans notre technique la *suppression des spores est une simple question de nutrition*, c'est là son grand intérêt. La réaction du milieu P. V. n'intervient pas, puisqu'elle est sensiblement voisine des milieux habituels, nous restons dans les limites d'une légère alcalinité. Ayant la possibilité d'obtenir d'une manière si aisée une bactériodie pratiquement asporogène, nous avons pensé que la virulence à son tour pouvait se trouver atténuée.

Sur des cobayes sains et vigoureux, nous avons pratiqué des injections sous-cutanées d'émulsions dans l'eau physiologique de cultures charbonneuses provenant de nos passages successifs sur le « milieu P. V. » solide.

Après la mort des cobayes, le plus rapidement possible, nous avons pratiqué leur autopsie, noté les diverses anomalies de leur organisme (œdèmes, hypertrophie de la rate, sang incoagulé, etc...) et procédé à l'examen microscopique du sang du cœur, des liquides œdémateux, des frottis du foie, de la rate et des reins.

Quatre séries d'inoculations ont été faites en inoculant successivement dans chaque série les divers passages de 1 à 5 inclus. Préalablement la virulence de la souche d'origine sur gélose peptonée a été vérifiée par inoculation à des cobayes : la mort

est survenue dans l'intervalle de 30 à 40 heures avec les caractères habituels de l'infection charbonneuse.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Nous décrivons successivement nos quatre séries d'inoculations (toutes ont été pratiquées vers 9 heures le matin).

I

29 *Juin*. — Inoculation du *premier passage* sur milieu P. V. à trois cobayes. Leur mort survient dans la nuit du 30 juin au 1^{er} juillet.

A l'*autopsie* : œdèmes caractéristiques, gélatineux, mais de coloration légèrement rosée au lieu d'être incolore. Le volume de ces œdèmes ne semble pas excessif, les rates sont relativement peu hypertrophiées. Dans le sang, les bactériidies sont plutôt courtes, assez nombreuses, se colorant normalement. Les frottis de rates montrent des bacilles également assez courts.

Le sang du cœur ensemencé sur gélose ordinaire donne lieu à un magnifique développement de bacilles charbonneux, mais ceux-ci demeurent de longueur plutôt réduite.

3 *Juillet*. — Inoculation d'un *deuxième passage* à trois cobayes. Mort des trois dans la nuit du 4 au 5 juillet.

A l'*autopsie*, nous trouvons des œdèmes accentués, légèrement rosés, des rates volumineuse chez l'un d'eux, un peu moins hypertrophiée chez un deuxième et presque normale chez le dernier.

Dans le sang les bâtonnets charbonneux sont très courts, on trouve des filaments de 2 et 3 éléments tout au plus. La coloration est normale par la méthode de Gram, peu intense au bleu de méthylène et à la safranine. Dans les reins les éléments charbonneux sont plus longs que dans le cœur ou la rate.

Les globules rouges du sang du cœur sont agglutinés par paquets irréguliers, très peu sont libres. Le liquide intercellulaire

est nettement jaune, indice d'un laquage important. Si on met à la chambre froide pendant quelques heures une goutte de sang étalée entre lame et lamelle, on peut constater la présence de petits cristaux triangulaires, qui sont des cristaux d'hémoglobine rendue libre par le laquage.

6 Juillet. — Inoculation d'un *troisième passage* à trois cobayes :

a) Un premier cobaye (poids 400 grammes) meurt le 9 juillet à 7 heures le soir, avec un retard d'environ 24 heures sur les témoins.

A l'*autopsie* : œdème assez peu accentué, rate très peu hypertrophiée. Les globules rouges sont agglutinés en amas irréguliers, quelques-uns cependant restent libres, ils sont nettement crénelés. Laquage peu important. Les bactériidies semblent plus longues et se colorent mieux par les divers procédés de coloration.

b) Un deuxième cobaye (poids 575 grammes) meurt le 11 juillet à 11 heures le matin.

A l'*autopsie* : œdème peu abondant, surtout localisé du côté opposé à l'injection. Rate très légèrement diffluente. Dans le sang du cœur : bacilles charbonneux redevenus normaux, à gram nettement positif. Liquide intercellulaire très légèrement laqué. A côté d'amas de globules rouges soudés entre eux, bon nombre sont libres, non altérés et de dimensions normales. Une particularité intéressante en ce qui concerne l'agglutination est que celle-ci disparaît presque complètement au bout d'un certain temps. En effet, après avoir recueilli du sang dans le cœur et constaté que les hématies sont partiellement agglutinées, si on le met une ou deux heures au froid pour l'examiner à nouveau par voie humide, on constate que toute l'agglutination a disparu et que les globules rouges sont devenus libres, indépendants les uns des autres et avec leurs caractères normaux, sauf un aspect crénelé évident. Le liquide d'œdème contient de nombreux bacilles charbonneux.

c) Enfin le troisième cobaye (poids 600 grammes) reste vivant.

9 Juillet. — Inoculation d'un *quatrième passage* à trois

cobayes (poids 600, 550, 450 grammes). Les trois cobayes survivent après une courte période de malaise.

12 *Juillet*. — Inoculation d'un *cinquième passage* à trois cobayes (poids 400, 425, 550 grammes). Les trois cobayes survivent.

II

Nous ne donnerons dans les expériences qui vont suivre que la marche générale des inoculations, les résultats d'autopsie et les examens microscopiques du sang étant analogues dans leurs grandes lignes aux indications données par la première série d'expériences.

5 *Septembre*. — Inoculation d'un *premier passage* à trois cobayes : mort des trois dans la nuit du 6 au 7 septembre.

9 *Septembre*. — Inoculation d'un *deuxième passage* à trois cobayes :

a) l'un d'eux meurt le 11 à 15 heures ;

b) un second meurt le 13 au matin à 10 heures ;

c) le dernier survit à l'inoculation. Ce dernier cobaye était particulièrement vigoureux (mâle, poids 700 grammes).

12 *Septembre*. — Inoculation d'un *troisième passage* à trois cobayes : ils survivent tous les trois.

15 *Septembre*. — Inoculation d'un *quatrième passage* à trois cobayes : tous survivent.

Nous n'avons pas jugé utile dans ces conditions d'inoculer le cinquième passage.

III

13 *Septembre*. — Inoculation d'un *premier passage* à deux cobayes. Ceux-ci sont morts dans la nuit du 14 au 15.

17 *Septembre*. — Inoculation du *deuxième passage* à deux cobayes. Ils meurent tous les deux dans la nuit du 18 au 19.

20 *Septembre*. — Inoculation du *troisième passage* à deux

cobayes. L'un d'eux meurt le mardi 23 à 17 heures, l'autre deux jours plus tard, le jeudi 25 à 19 heures.

23 *Septembre*. — Inoculation du *quatrième passage* à deux cobayes. L'un et l'autre survivent.

26 *Septembre*. — Inoculation du *cinquième passage* à deux cobayes. Tous les deux survivent.

IV

Dans cette quatrième série d'expériences nous avons associé à la *bactéridie charbonneuse* des *staphylocoques* en les injectant simultanément à des cobayes. L'action antagoniste dans les cultures de certaines bactéries vis-à-vis du bacille du Charbon est bien connue. C'est le cas du bacille pyocyanique, du pneumobacille, du streptocoque, du staphylocoque. Une culture charbonneuse sur gélose souillée de staphylocoques ou de streptocoques présente des filaments avec des éléments de plus en plus courts, de plus en plus anémiés et ces cocci à un stade avancé de vieillissement supplantent même complètement tous les bâtonnets bactériens, qui finissent par se lyser. Les auteurs ajoutent que l'action antagoniste de ces microbes banaux est bien moins accentuée *in vivo*. Les expériences que nous avons faites avec le staphylocoque montrent que l'association staphylocoque-bacille du Charbon favorise nettement l'action virulente de la bactéridie et tue le cobaye qui aurait résisté sans elle.

Pour ces expériences nous avons émulsionné ensemble dans du sérum physiologique d'une part des staphylocoques, provenant d'une culture sur gélose, et d'autre part des bacilles charbonneux, prélevés sur un troisième et un quatrième passage en « milieu P. V. ».

15 *Septembre*. — Inoculation à trois cobayes de *staphylocoques* et de bacilles charbonneux *troisième passage*. Entre lame et lamelle au microscope, les cocci sont dans la proportion de 2 pour 1 bâtonnet.

a) Mort de l'un des cobayes le 17 à 19 heures.

Autopsie : traces hémorragiques au point d'inoculation

œdème assez peu accentué, rate très peu hypertrophiée. Dans le sang du cœur les globules rouges sont très agglutinés, les bacilles charbonneux s'y trouvent en quantité normale, on ne rencontre pas de staphylocoques. Le sang est laqué, petits cristaux d'hémoglobine en formation.

b) Un deuxième cobaye meurt le 19 à 17 heures.

Autopsie : œdème assez abondant, rate très peu diffluent. Dans le sang du cœur, les globules sont moins agglutinés que dans le cas précédent, quelques-uns sont libres, à bords crénelés. Liquide interglobulaire très laqué. Liquide œdémateux contenant de nombreux bacilles charbonneux. De petits abcès blancs avoisinant le point d'inoculation contiennent des staphylocoques, ceux-ci sont rares dans le liquide d'œdème.

c) Le dernier cobaye succombe le 20 à midi.

Autopsie : Globules du sang du cœur un peu moins agglutinés, sang laqué. Absence de staphylocoques. Les bâtonnets charbonneux sont normaux.

Quelques staphylocoques se trouvent épars dans le liquide d'œdème, très rosé au point d'inoculation, les bacilles charbonneux s'y rencontrent très nombreux.

18 Septembre. — Inoculation de *staphylocoques* et de bacilles charbonneux *quatrième passage* à trois cobayes. Entre lame et lamelle au microscope nous avons une proportion sensiblement égale des deux microbes.

a) Un des cobayes meurt dans la nuit du 20 au 21 (poids 800 grammes).

A l'*autopsie* : œdème relativement peu abondant. Rate hypertrophiée, diffluent. Plaque hémorragique très nette au point d'inoculation.

Dans le sang du cœur, les globules rouges sont de moins en moins agglutinés, ils ont leurs bords nettement crénelés.

L'hémoglobine a été dissoute et forme rapidement de beaux cristaux triangulaires. La formation de ces cristaux est favorisée par le séjour au froid des cadavres et c'est là, disons-le en passant, un moyen facile de contrôler le laquage des globules rouges dans le sérum.

Bacilles de dimensions et de colorations normales. Absence de staphylocoques. Dans le liquide d'œdème on note quelques cocci à gram positif et de nombreux bâtonnets charbonneux. Un petit abcès purulent se trouve localisé près du point d'inoculation, son contenu est très riche en staphylocoques.

b) Un second meurt le 23 à 9 heures le matin (poids 425 grammes).

A l'autopsie : œdème peu prononcé, rate volumineuse. Plaque hémorragique au point d'inoculation.

Examen du sang du cœur : bâtonnets normaux, laquage très net. Globules rouges assez peu dispersés, quelques-uns sont crénelés.

c) Le troisième meurt le 24 à 18 heures (poids 540 grammes).

A l'autopsie : caractères de l'infection charbonneuse, rate très diffluente, sang du cœur peu agglutiné, bâtonnets charbonneux normaux, pas de staphylocoques, quelques-uns seulement dans le liquide d'œdème et en quantité notable dans de petits abcès violacés au niveau des gaines génitales.

Le sang du cœur ensemencé sur gélose nous donne des bacilles du Charbon trapus, un peu courts, la sporulation est normale et abondante.

*
* *

Nous réunirons dans le tableau schématique suivant les résultats obtenus dans ces quatre séries d'expériences. Les chiffres donnés dans le tableau indiquent le nombre d'heures écoulées entre l'inoculation et la mort des cobayes.

En résumé, au premier passage la mort survient dans les délais normaux, au deuxième également, sauf dans la deuxième série où l'atténuation est déjà sensible. Au troisième passage la virulence s'affaiblit nettement au point de ne plus tuer à coup sûr le cobaye. Enfin les quatrième et cinquième passages fournissent une race de bacille charbonneux ne présentant plus aucune nocivité mortelle pour nos animaux d'expérience et cela d'une façon régulière et certaine. En ce qui concerne l'association du

staphylocoque au bacille charbonneux atténué, elle sensibilise nettement le cobaye, en provoquant sans doute une infection secondaire, infection suppurative locale, qui contrarie sa résistance. Nous avons pu suivre ainsi pas à pas les progrès de l'atténuation.

		1 ^{er} passage	2 ^e passage	3 ^e passage	4 ^e passage	5 ^e passage
1 ^{re} série . . .	Cobaye 1	39	39	58	survie	survie
	— 2	39	39	98	survie	survie
	— 3	39	39	survie	survie	survie
2 ^e série . . .	Cobaye 1	39	54	survie	survie	
	— 2	39	97	survie	survie	
	— 3	39	survie	survie	survie	
3 ^e série . . .	Cobaye 1	39	39	56	survie	survie
	— 2	39	39	106	survie	survie
4 ^e série (+ staphylocoques).	Cobaye 1			58	63	
	— 2			104	120	
	— 3			123	153	

Sur les cadavres la bactériémie se présente d'une façon générale avec des articles plus courts que normalement. D'autre part, dès le deuxième passage les lésions classiques de l'infection charbonneuse vont en diminuant : rate moins hypertrophiée, œdème plus localisé, l'agglutination des hématies en amas irréguliers est moins massive. Aux troisième et quatrième passages l'œdème est peu étendu, il persiste quatre à cinq jours, puis il disparaît complètement.

L'ensemble de ces faits montre que *la bactériémie s'atténue progressivement et finit par devenir non pathogène*, en même temps les quelques rares spores encore présentes se trouvent atténuées au même degré que le mycélium dont elles dérivent. Nous avons donc réalisé expérimental ment, d'une façon indirecte toutefois,

l'atténuation des spores bactériennes en général et des spores charbonneuses en particulier.

La spore ou graine fixe la virulence du mycélium qui lui a donné naissance.

C. — RETOUR A LA VIRULENCE DE LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE ATTÉNUÉE

Sur les conseils de M. le Professeur Achard, après avoir obtenu l'atténuation de la virulence de la bactéridie charbonneuse par simple passage sur « milieu P. V. » ou milieu « de carence », nous avons pensé pouvoir lui redonner sa virulence initiale en la cultivant cette fois sur des milieux riches et en particulier sur le milieu classique : la gélose peptonée. On sait qu'en ce qui concerne la bactéridie atténuée par la chaleur les repiquages sur ce milieu redonnent bien les formes mycéliennes normales avec des spores, mais la virulence ne reparait pas, il faut recourir aux petits animaux (méthode PASTEUR). Cette action de la chaleur, comme d'ailleurs des antiseptiques, est certainement plus brutale et beaucoup plus dangereuse pour la vitalité des microbes qu'un simple changement de milieu nutritif et c'est ce qui explique peut-être cette persistance de la non virulence.

Nous avons donc procédé à des repiquages successifs sur gélose ordinaire de la bactéridie atténuée et nous avons inoculé les nouvelles cultures obtenues.

Les passages 4 et 5 sur milieu P. V. sont repiqués le 30 septembre sur gélose inclinée. On maintient les nouvelles cultures 3 jours à l'étuve. Pendant les premières 24 heures le développement est pour ainsi dire nul, au deuxième jour la culture part normalement et le troisième jour la couche crémeuse habituelle est formée.

Le 2 octobre, quatre cobayes sont inoculés sous la peau avec une émulsion du passage 4 sur gélose 1, quatre autres avec une émulsion du passage 5 sur gélose 1. Onensemence sur gélose neuve les deux cultures de ce premier passage. Le développement

microbien commence cette fois dès les premières 24 heures, la bactéridie s'est réadaptée au milieu peptoné.

Après trois jours d'étuve, le 5 octobre, on inocule quatre cobayes avec le deuxième repiquage du passage 4, quatre autres avec le deuxième repiquage du passage 5. On fait le troisième repiquage sur gélose, deux jours d'étuve suffisent pour avoir un développement microbien normal.

Le 7 octobre, huit nouveaux cobayes sont inoculés, quatre avec le passage 4 sur gélose 3, quatre avec le passage 5 sur gélose 3. On procède en même temps au 4^e repiquage, que nous inoculerons à quatre cobayes le 9 et ainsi de suite jusqu'au huitième réensemencement.

Ainsi donc la bactéridie atténuée sur milieu P. V. et reportée sur milieu gélose peptonée se réadapte assez facilement, en même temps que réapparaissent les formes mycéliennes habituelles, abondamment sporulées.

Les inoculations aux cobayes ont été faites avec quelques gouttes de l'émulsion physiologique de ces cultures.

Or à l'exception de trois cobayes tous les autres, soit quarante et un, ont survécu à l'inoculation, établissant nettement que le *Charbon n'a pas retrouvé sa virulence* bien qu'il soit redevenu morphologiquement normal.

Nous avons étudié avec soin le cas des trois cobayes morts : l'un d'eux inoculé le 2 octobre avec le passage 4 sur gélose 1 est mort le 11 octobre au matin, le second inoculé le 5 octobre avec le passage 5 sur gélose 2 est mort le 13 octobre à 11 heures, le dernier inoculé le 11 octobre avec le passage 5 sur gélose 5, est mort le 15 à 17 heures.

A l'examen des cadavres, on constate une inflammation considérable des organes génitaux pour les deux premiers cobayes (mâles). Chez les trois il y a eu infection des plaies d'inoculation avec suppuration diffuse dans les régions abdominales et surtout génitales voisines.

A l'autopsie de chacun de ces trois cobayes, on note un volumineux œdème rouge avec des foyers purulents dans la région génitale, le pus est abondant autour du point où l'inoculation a

été pratiquée. Il existe une forte congestion de la masse gastro-intestinale, la rate paraît un peu hypertrophiée mais ferme. Les organes thoraciques sont simplement congestionnés.

Dans le sang du cœur les hématies ne sont pas agglutinées et sont à peine crénelées. A l'examen bactériologique du sang, du pus, des œdèmes : présence abondante de staphylocoques, absence de bactéridies. Tout laisse penser que les trois sujets ont succombé à une infection purulente surajoutée accidentellement. Ajoutons néanmoins que les cultures du sang du cœur sur gélose peptonée ont permis de retrouver quelques très rares bacilles charbonneux à côté d'une quantité considérable de staphylocoques. La mort des sujets doit probablement être attribuée à une pyohémie staphylococcique avant la phagocytose complète des bacilles charbonneux.

D.— CONTROLE DE L'IMMUNITÉ DES COBAYES INOCULÉS AVEC LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE ATTÉNUÉE

Il était indiqué, pour compléter la démonstration de l'atténuation effective de la bactéridie charbonneuse aux 4^e et 5^e passages sur gélose-gélatine, de rechercher si les cobayes ayant résisté à l'inoculation avaient acquis une immunité plus ou moins active vis-à-vis d'un Charbon virulent.

L'expérience a été réalisée sur dix de ces cobayes, qui après un repos de 35 à 40 jours avaient repris toute leur vigueur et même augmenté assez fortement de poids. Le 4 novembre (16 heures), nous avons injecté à chacun d'eux une goutte d'émulsion dans l'eau physiologique d'une culture charbonneuse de 48 heures sur gélose. Quatre sujets neufs ont été inoculés en même temps comme témoins.

Les quatre témoins ont succombé le lendemain soir 5, l'un vers 10 heures, deux autres vers 11 heures et le dernier dans la nuit. Parmi les sujets déjà inoculés, l'un est mort dans la matinée du 6, deux dans la nuit du 6 au 7, deux dans l'après-midi du 7,

un dans la nuit du 7 au 8, deux le 8 vers midi et le dernier dans la soirée du même jour.

L'autopsie des cadavres a révélé les altérations et lésions classiques du Charbon. Le sang était envahi par de nombreux bâtonnets et les hématies étaient assez fortement agglutinées.

La conclusion très nette est donc qu'il n'y a pas eu immunisation. Malgré tout la bactériémie atténuée au point de ne plus tuer le cobaye, cependant si sensible, semble avoir très légèrement augmenté la résistance des sujets inoculés : la mort des dix cobayes est survenue dans des délais nettement supérieurs au temps normal. Nous devons ajouter que ce contrôle n'a qu'une valeur toute relative, car on sait que les petits animaux, en particulier le lapin et le cobaye, se prêtent mal à l'expérimentation en matière de vaccination anti-charbonneuse. Et puis des doses de microbes mieux calculées, injectées par séries progressives, nous auraient peut-être permis d'aboutir à de meilleurs résultats. L'extrême modicité des ressources que nous avions à notre disposition ne nous a malheureusement pas permis de faire nos recherches sur une base expérimentale plus grande et de nous adresser à des animaux plus favorables.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1° Les conditions de développement de la bactéridie charbonneuse sur les milieux de culture sont relativement étroites, le pH notamment oscille entre 6,4 et 8,4.

2° L'étude des variations du pH et de l'alcalinité totale montre que les modifications chimiques des milieux, sur lesquels s'est développée la Bactéridie, sont relativement peu accentuées. On note une légère production d'ammoniac.

3° Les conditions de nutrition sont également assez étroites. Les milieux classiques sont les meilleurs : eau peptonée, bouillon peptoné, gélose peptonée. Des nombreux milieux synthétiques essayés, les uns déjà en usage dans la pratique bactériologique, les autres que nous avons réalisés nous-même pour pouvoir étudier de plus près l'activité de la bactéridie et les produits qui en découlent, aucun ne nous a donné de résultat nettement satisfaisant.

Seuls des milieux « de carence », imaginés par M. PIETTRE, déjà plus complexes d'ailleurs, nous ont conduit à des conclusions intéressantes en nous orientant dans une voie bien inattendue : la création d'une forme asporogène de Charbon, pouvant devenir en même temps par perte rapide de virulence une bactéridie complètement saprophyte.

4° Le milieu de carence le plus favorable, appelé « milieu P.V. », est composé d'un mélange gélose-gélatine, minéralisé par addition de phosphate bipotassique et de chlorure de sodium. Le calcium est apporté en quantité suffisante par l'agar-agar. Ce

milieu impose des modifications très importantes à la bactériodie, les unes morphologiques, les autres biologiques, aboutissant à la disparition de toute virulence.

Les modifications morphologiques se traduisent au début, pendant la période d'adaptation, par l'apparition de formes bacillaires anormales, incurvées, repliées sur elles-mêmes. Mais dès le 3^e passage le développement microbien est luxuriant, les filaments sont plus longs, flexueux, entremêlés, leurs articles toutefois sont relativement courts, quant aux spores elles ont presque complètement disparu, au 4^e passage on en compte à peine quelques très rares par champ de microscope, pratiquement on a une *bactériodie asporogène*.

La virulence diminue très rapidement, déjà au 3^e passage sur « milieu P.V. » les cobayes, si sensibles cependant, ne meurent pas tous, à partir du 4^e passage toute virulence a disparu et tous les animaux inoculés, même très abondamment, résistent.

5° La bactériodie ainsi devenue saprophyte ne provoque chez les cobayes, auxquels on l'inocule, qu'une résistance insignifiante à la forme virulente. Il faut dire toutefois que les cobayes ne sont pas les animaux de choix pour des essais de vaccination anti-charbonneuse.

6° La disparition progressive des spores dans les milieux de carence est en contradiction avec l'opinion classique qui veut, au contraire, que les milieux pauvres soient très favorables à la sporulation. La spore n'est pas seulement une forme de résistance, nos expériences sur la relation entre la production des spores et la richesse du milieu nous conduisent bien à considérer la spore comme la graine au sens botanique du mot et à conclure que dans une culture la proportion des spores sera d'autant plus importante que le milieu sera plus riche et inversement.

7° La sporulation s'accompagne d'une désintégration importante du corps bacillaire et c'est aux cultures richement sporulées qu'il convient de s'adresser pour étudier les autolysats.

La filtration sur bougie des cultures charbonneuses sporulées nous a permis de constater la présence très nette de produits protidiques, résultat de la lyse microbienne. Non seulement ces filtrats, mais encore les substances actives isolées de ces filtrats par précipitation acétonique, acide ou alcaline, donnent au contact d'un sérum anti-charbonneux une floculation spécifique, équivalente à une séro-précipitation et cela en l'absence de tout élément microbien.

8° Poussant plus loin les recherches dans cette voie, il a été possible d'établir une relation étroite entre ces substances et les constituants protidiques des corps microbiens eux-mêmes. Par l'attaque ménagée à l'aide de solutions alcalines étendues, on obtient des extraits bacillaires, riches en nucléo-protéides, possédant des propriétés précipitogènes analogues à celles des autolysats.

9° L'étude de l'action de ces deux formes d'antigène (corps microbiens et substances spécifiques dues à une autolyse naturelle ou à une attaque chimique) d'une part et des anticorps sériques d'autre part conduit à rapprocher, selon la conception de M. PIETTRE, les réactions d'agglutination courantes des réactions de séro-précipitation.

Vu :

Le Président de la thèse,
RADAIS.

Vu :

Le Doyen,
RADAIS.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLÉTY.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- AET (G.). — Sur la production de races asporogènes de bactériodie charbonneuse. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, t. LXXXIV, p. 627.
- ARCAND (A.). — *Recherches sur le dosage des Protides du sérum sanguin et des liquides pathologiques par la méthode à l'acétone de Pieltre et Vila*. Thèse Doct. Pharmacie, Paris, 1930.
- BACH (D.). — *Contribution à l'étude de la nutrition azotée de l'Aspergillus Repens de Bary*. Thèse doctorat ès-sciences, Paris, 1925.
- BALTEANO (L.). — L'infection charbonneuse et l'immunité anti-charbonneuse chez le Lapin et le Cobaye. *Ann. Inst. Past.*, 1922, t. XXXVI, p. 805.
- BEHRING (E.). — Beitrag zur Aetiologie des Milzbrandes. *Zeitschrift f. Hygiene*, 1889, t. VII, p. 171.
- BLAGOVESTCKENSKY (N.). — Antagonisme entre la bactériodie charbonneuse et le bacille pyocyanique. *Ann. Inst. Past.*, 1890, t. IV, p. 689.
- BORDET (J.). — Influence du calcium sur les caractères des espèces microbiennes. *Ann. Inst. Past.*, 1930, t. XLV, p. 26.
- BORDET (J.) et RENAUX (E.). — L'influence du calcium sur l'évolution des cultures de Charbon. *Ann. Inst. Past.*, 1930, t. XLV, p. 1.
- CAHEN (B.) and CLARK (M.). — The growth of certain bacteria in media of different hydrogen ion concentrations. *Journ. Bacteriol.*, 1919, t. IV, p. 409.
- CHAMBERLAND (CH.). — *Le Charbon et la vaccination charbon-*

neuse d'après les récents travaux de M. Pasteur. Bernard Tignol, éditeur, Paris, 1883.

CHAMBERLAND (Ch.) et ROUX (E.). — Sur l'atténuation de la virulence de la bactériodie charbonneuse sous l'influence des substances antiseptiques. *C. R. Acad. des Sc.*, 1883, t. XCVI, p. 1088.

CHAMBERLAND (Ch.) et ROUX (E.). — Sur l'atténuation de la virulence de la bactériodie charbonneuse et de ses germes sous l'influence des antiseptiques. *C. R. Ac. des Sc.*, 1883, t. XCVI, p. 1410.

CHAMBERLAND (Ch.) et ROUX (E.). — Vaccination des lapins contre le Charbon. *Ann. Inst. Past.*, 1887, t. I, p. 513.

CHAUVEAU (A.). — De l'atténuation rapide et directe des cultures virulentes par l'action de la chaleur. *C. R. Ac. des Sc.*, 1883, t. XCVI, p. 553.

CHAUVEAU (A.). — Du rôle respectif de l'oxygène et de la chaleur dans l'atténuation du virus charbonneux par la méthode de M. Pasteur. Théorie générale de l'atténuation par l'application de ces deux agents aux microbes aérobies. *C. R. Ac. des Sc.*, 1883, t. XCVI, p. 1471.

CHAUVEAU (A.). — De l'atténuation des cultures virulentes par l'oxygène comprimé. *C. R. Ac. des Sc.*, 1884, t. XCVIII, p. 1232.

CLARK (M.). The final hydrogen ion concentration of cultures of *Bacillus Coli*. *Journ. of Biol. Chem.*, 1915, t. XXII, p. 87.

CLARK (M.). — *The determination of hydrogen ions*. Second Edition, Baltimore, 1922.

CLARK (M.) and LUBS (M.). — The colorimetric determination of hydrogen ion concentration and its application in Bacteriology. *Journ. Bact.*, 1917, t. II, p. 1-109.

CLUZET, ROCHAIX et KOFMAN. — Concentrations optima et concentrations limites en ions H des cultures microbiennes. Variations produites par les microbes vers les concentrations optima. *C. R. Ac. des Sc.*, 1924, t. CLXXXVIII, p. 1638.

DOURIS (R.). — Une nouvelle notation de l'acidité. *Bull. des Sc. pharmacol.*, 1925, t. XXX, p. 543.

- DUCLoux (E.). — Sur la formation de races asporogènes du bacillus anthracis. Atténuation de sa virulence. *C. R. Ac. des Sc.*, 1920, t. CLXX, p. 1527.
- DUCLoux (E.). — Atténuation de la virulence du bacillus anthracis à forme asporogène. Pouvoir immunisant du bacille atténué. *C. R. Ac. des Sc.*, 1924, t. CLXXIX, p. 510.
- EISENBERG (P.). — Ueber sporogene und asporogene rassen des Milzbrandbacillus. *Centralbl. f. Bacteriol. Originale*, 1912, t. LXIII, p. 305.
- EISENBERG (P.). — Weitere untersuchungen über das sporenbildungsvermögen bei Milzbrandbacillen. *Centralbl. f. Bacteriol. Originale*, 1914, t. LXXIII, p. 81.
- GIOVARDANI (A.). — Sull'antagonismo fra B. Coli et B. del Carbonchio. *Boll. Istit. Sieroterap. Milanese*, 1930, t. IX, p. 9.
- HADLEY (Ph.). — Microbic dissociation. *Journ. of infectious diseases*, 1927, t. XL, p. 1.
- HUNDESHAGEN (Fr.). — Analytische studien über die Phosphordodekamolybdänsäure die Bedingungen ihrer Bildung und ihrer Abscheidung als Ammoniumsalz. *Zeitschrift f. analyt. chem.*, 1889, t. XXVIII, p. 141.
- KOLTHOFF (I.). — L'erreur de sel des indicateurs colorants. *Recueil Trav. Chim. des Pays-Bas*, 1922, t. XLI, p. 54.
- LEGENDRE (R.). — *La concentration en ions hydrogène de l'eau de mer. Le pH*. Presses Universitaires de France, 1925.
- LEHMANN (A.). — Über die Sporenbildung bei Milzbrand. *Munchener medicinische wochenschrift*, 1887, p. 485.
- MARINO (F.). Immunisation du cobaye contre le Charbon et questions relatives à l'immunité anticharbonneuse. *Journ. Physiol. et Pathol. génér.*, 1924, t. XXII, p. 349.
- MAUTÉ (A.). — Thérapeutique spécifique des infections staphylococciques. *Presse Médicale*, n° 14, 10 février 1924.
- MAUTÉ (A.). — A propos de la bactériothérapie de quelques infections communes. *Presse Médicale*, n° 98, 8 décembre 1926.
- MAURICE (H.). — *Variation avec l'âge de la teneur de quelques organes en phosphore total*. Thèse Fribourg, 1910.

- METCHNIKOFF (El.). — Immunité contre le Charbon bactérien. *Ann. Inst. Past.*, 1890, t. IV, p. 513.
- MONTEIRO (J. L.). — Les différentes phases de l'autolyse du bacillus anthracis. *C. R. Soc. Biol. (Société brésilienne de Biologie)*, 1925, t. XCIII, p. 975.
- NEGRO (F.). — Immunizzazione attiva della cavia di fronte all' infezione carbonchiosa. *Pathologica*, 1926, t. XVIII, p. 539.
- NICOLLE (M.). — Une conception générale des anticorps et de leurs effets : les anticorps normaux. *Ann. Inst. Past.*, 1908, t. XXII, p. 237.
- NICOLLE (M.) et POZERSKY (E.). — Une conception générale des anticorps et de leurs effets : les anticorps des toxines solubles. *Ann. Inst. Past.*, 1908, t. XXII, p. 26.
- NICOLLE (M.) et ABT (G.). — Une conception générale des anticorps et de leurs effets : les anticorps des albuminoïdes et des cellules. *Ann. Inst. Past.*, 1908, t. XXII, p. 132.
- NICOLLE (M.) et ALILAIRE (E.). — Note sur la production en grand des corps bactériens et sur leur composition chimique. *Ann. Inst. Past.*, 1909, t. XXIII, p. 547.
- NICOLLE (M.) et CESARI (E.). — Etude sur la précipitation mutuelle des anticorps et antigènes. Sérums anticellulaires. Valeur de la réaction précipitante. *Ann. Inst. Past.*, 1920, t. XXXIV, p. 709.
- NICOLLE (M.) et CESARI (E.). — Colloïdes. Catalyse. Antigènes, anticorps. *Ann. Inst. Past.*, 1922, t. XXXVI, p. 463.
- NITTIS (J. DE). — Immunité des Pigeons et des Cobayes vaccinés contre le Charbon bactérien et sur les propriétés de leur sérum. *Ann. Inst. Past.*, 1901, t. XV, p. 769.
- NUNGESTER (W.). — Dissociation of b. anthracis. *Proceed. Soc. for exper. Biol. and Med.*, 1927, t. XXIV, p. 959.
- NUNGESTER (W.). — Dissociation of b. anthracis. *Journ. of inf. dis.*, 1929, t. XLIV, p. 73.
- PASTEUR (L.). — Etude sur la maladie charbonneuse. *C. R. Ac. des Sc.*, 1880, t. XCI, p. 107.
- PASTEUR (L.), CHAMBERLAND (Ch.) et ROUX (E.). — De l'atté-

- nuation des virus et de leur retour à la virulence. *C. R. Ac. des Sc.*, 1881, t. XCII, p. 429.
- PERDRIX (L.). — Transformation des matières azotées par la bactériidie charbonneuse. *Ann. Inst. Past.*, 1888, t. II, p. 354.
- PHYSALIX (C.). — Influence de la chaleur sur les propriétés sporogènes du bacillus anthracis, abolition persistante de cette fonction par hérédité des caractères acquis. *Archives de Physiologie*, 1893, p. 217.
- PHYSALIX (C.). — Sur une variété de bacille charbonneux à forme courte et sporogène : bacillus anthracis brevigemmans. *C. R. Ac. des Sc.*, 1900, t. CXXXI, p. 424.
- PIETTRE (M.). — Séparation des Protéides du blanc d'œuf par la méthode à l'acétone. *R. C. Ac. des Sc.*, 1923, t. CLXXVIII, p. 91.
- PIETTRE (M.). — Sur les protéides du Lactosérum. Leur séparation par la méthode à l'acétone. *C. R. Ac. des Sc.*, 1923, t. CLXXVIII, p. 333.
- PIETTRE (M.). — Microbiologie du sol (in *Production industrielle du Café*). Lefrançois, éditeur, Paris, 1925, p. 205.
- PIETTRE (M.) et CHRÉTIEN (A.). — Biochimie de l'Hémolyse. Edition de la *Revue de Pathologie comparée et d'hygiène générale*. Paris, 1927.
- PIETTRE (M.) et CHRÉTIEN (A.). — Contribution à l'étude biochimique de l'Agglutination. Edition de la *Revue de Pathologie comparée et d'Hygiène générale*. Paris, 1929.
- PIETTRE (M.) et VILA (A.). — Sur la séparation des Protéines du sérum. *C. R. Ac. des Sc.*, 1920, t. CLXX, p. 1466.
- PIETTRE (M.) et VILA (A.). — Sur quelques propriétés de la sérine. *C. R. Ac. des Sc.*, 1920, t. CLXXI, p. 372.
- PIETTRE (M.) et VILLEDIEU (P.). — L'atténuation de la virulence de la bactériidie charbonneuse en fonction de la nutrition. *C. R. Ac. des Sc.*, 1930, t. CXCI, p. 886.
- PREISZ (D.). — Studien über morphologie und biologie des Milzbrandbacillus. *Centralbl. f. Bacter. Originale*, 1903, t. XXXV, p. 280, 416, 537, 657.

- RAULIN (P.). — Etude chimique sur la végétation. *Ann. de Sc. naturelles*, 1869, série 5, t. II, p. 93.
- ROUX (E.). — Bactéridie charbonneuse asporogène. *Ann. Inst. Past.*, 1890, t. IV, p. 25.
- ROUX (E.). — De l'action de la chaleur et de l'air sur les spores de la bactéridie du Charbon. *Ann. Inst. Past.*, 1887, t. I, p. 392 et 445.
- SIERAKOWSKY (S.). — Variations et nature des concentrations en ions H des cultures bactériennes. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, t. LXXXIX, p. 1371.
- SILBERSCHMIDT (W.) et SCHOCH (E.). — Antagonisme entre la bactéridie charbonneuse et divers microbes. *Ann. Inst. Past.*, 1920, t. XXXIV, p. 669.
- SURMONT (H.) et ARNOULD (E.). — Recherches sur la production du bacille du Charbon asporogène. *Ann. Inst. Past.*, 1894, t. VIII, p. 817.
- TREADWELL (F. P.). — *Lerbruch der analyt. chem.*, 1907, t. II, p. 330. Traduction française par Düringer (E.) et Goscinnny (S.). Dunod et Pinat, édit. Paris, 1912, t. II, p. 407.
- VILA (A.). — Influence de la chaleur et de quelques dissolvants sur la viscosité du sérum de cheval. *C. R. Ac. des Sc.*, 1922, t. CLXXIV, p. 1131.
- WEINBERG (M.) et BAROTTE (J.). — Synergie des Anticorps. *Ann. Inst. Past.*, 1928, t. XLII, p. 619.
- WOY (E.). — Die Bestimmung des Phosphorsäure als Phosphorsäure-molybdänsäureanhydrid. *Chemiker Zeitung*, 1897, t. XXI, p. 442 et 469.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	1
PLAN DU TRAVAIL	5
PREMIÈRE PARTIE : <i>Influence de la richesse du milieu de culture sur le développement de la bactéridie charbonneuse et plus particulièrement sur la sporulation.</i>	7
DEUXIÈME PARTIE : <i>Autolysats, dérivés de l'antigène : application à la bactéridie charbonneuse.</i>	21
TROISIÈME PARTIE : <i>Extraits bacillaires : application à la bactéridie charbonneuse</i>	45
QUATRIÈME PARTIE : <i>Le développement de la bactéridie charbonneuse sur les milieux de culture : pH, acidité et alcalinité de ces milieux.</i>	55
CINQUIÈME PARTIE : <i>La bactéridie charbonneuse : formes asporogènes, atténuation de la virulence.</i>	77
A. — Bactéridie charbonneuse asporogène	77
B. — Atténuation de la virulence de la bactéridie charbonneuse asporogène	87
C. — Retour à la virulence de la bactéridie charbonneuse atténuée	96
D. — Contrôle de l'immunité des cobayes inoculés avec la bactéridie charbonneuse atténuée	98
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	101
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	105
TABLE DES MATIÈRES	111

Etablissements André BRULLIAND, Saint-Dizier (Hte-Marne). -- 1931.
